

Peter Demmel

Der Einfluß
der Stoffwechselkontrolle
auf die Thrombozytenfunktion
des Diabetikers

Dr. M. München
1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0028

Aus der III. Medizinischen Abteilung des
Akademischen Lehrkrankenhauses München-Schwabing
(Chefarzt: Prof. Dr. H. Mehnert)

Der Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die
Thrombozytenfunktion des Diabetikers

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Demmel
aus
München
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. H.-J. Janka

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.1983

Meinen Eltern

1. Meine Eltern

1.1. Meine Eltern

1.2. Meine Eltern

1.3. Meine Eltern

2. Meine Eltern

3. Meine Eltern

3.1. Meine Eltern

3.2. Meine Eltern

3.3. Meine Eltern

3.4. Meine Eltern

3.5. Meine Eltern

3.6. Meine Eltern

3.7. Meine Eltern

3.8. Meine Eltern

3.9. Meine Eltern

3.10. Meine Eltern

3.11. Meine Eltern

3.12. Meine Eltern

3.13. Meine Eltern

3.14. Meine Eltern

3.15. Meine Eltern

4. Meine Eltern

5. Meine Eltern

5.1. Meine Eltern

5.2. Meine Eltern

5.3. Meine Eltern

5.4. Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Theoretische Vorbemerkungen: Thrombozytenphysiologie	3
2.1 Induzierte Thrombozytenaggregation	4
2.2 β -Thromboglobulin (β -TG)	5
2.3 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	5
3. Patientenkollektive	7
4. Methodik	9
4.1 Thrombozytenaggregation	9
4.1.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma	9
4.1.2 Aufzeichnung der Thrombozytenaggregation	9
4.1.3 Auswertung der Aggregationskurven	10
4.2 Zyklisches Adenosinmonophosphat im plättchenreichen Plasma	17
4.2.1 Inkubation	17
4.2.2 Extraktion	17
4.2.3 Messung	18
4.3 β -Thromboglobulin	20
4.4 Beurteilung der Diabeteseinstellung	22
4.4.1 Glykosyliertes Hämoglobin (HbA _{1c})	22
4.4.2 Blutzucker, Blutfette	23
4.5 Statistik	24
5. Ergebnisse	25
5.1 Thrombozytenaggregation	25
5.1.1 Comastudie	25
5.1.2 Typ I-Diabetiker	28
5.1.3 Typ II-Diabetiker	34

	Seite
5.2 Zyklisches Adenosinmonophosphat	38
5.2.1 Comastudie	38
5.2.2 Typ I-Diabetiker	40
5.2.3 Typ II-Diabetiker	43
5.3 β -Thromboglobulin	43
5.4 Blutfette	45
5.5 Korrelationsberechnungen	45
5.5.1 HbA _{1c} und Blutzuckerwerte	45
5.5.2 Thrombozytenaggregation und Blutzucker- werte / HbA _{1c}	48
5.5.3 Thrombozytenaggregation und Diabetesdauer	48
6. Diskussion	54
6.1 Bisherige Untersuchungen der Thrombozytenaggregation bei Diabetikern	54
6.2 Thrombozytenaggregation	55
6.2.1 Problematik der Messung und Auswertung der Thrombozytenaggregation	55
6.2.2 Comastudie	56
6.2.3 Typ I-Diabetiker	56
6.2.4 Typ II-Diabetiker	58
6.3 Zyklisches Adenosinmonophosphat im plättchen- reichen Plasma	60
6.4 β -Thromboglobulin	62
6.5 Blutfette	64
6.6 Abschließende Betrachtung der Ergebnisse	64
7. Zusammenfassung	67
8. Literaturverzeichnis	69

Liste der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
HbA ₁	Hämoglobin A ₁
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat (Anion)
HDL-Chol.	high-density-lipoprotein-Cholesterin
IBMX	3-Isobutyl -1- methylxanthin
PAP	plättchenarmes Plasma
PAT	Plättchen-Aggregations-Test
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (Prostacyclin)
PRP	plättchenreiches Plasma
RIA	Radioimmunoassay
B-TG	ß-Thromboglobulin
TXA ₂	Thromboxan A ₂

1. Einleitung

Die in den letzten Jahren entwickelten Theorien über die Pathogenese sowohl der Makro- als auch der Mikroangiopathie des Diabetikers lassen der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktion eine bedeutende Rolle zukommen [5, 43, 85, 86]. Bezüglich der Arteriosklerose basieren sie auf der alten Virchow'schen Hypothese der Verletzung der Intima und einer sekundären pathologischen Gefäßwandreaktion [106]. Am Ort des Endothelschadens setzt eine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten ein; es folgt eine Sekretion von Plättcheninhaltsstoffen, die ihrerseits eine zusätzliche Thrombozytenaggregation bewirken. Unter diesen aus den Thrombozytengranula freigesetzten Stoffen konnte ein Plättchen-Wachstumsfaktor isoliert werden [8], der die Proliferation und Einsprossung glatter Muskelzellen aus der Tunica media der Arterienwand in die Intima stimuliert. Lipidansammlungen in diesen Zellen und herdförmige Verkalkung führen zu atheromatösen Beeten, die wiederum die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und damit die Entstehung thrombotischer Auflagerungen begünstigen. Plättchen-Thromben und mikrovaskuläre Obliterationen sind auch charakteristisch für die diabetische Mikroangiopathie [25, 47]. Ähnlich der Pathogenese der Makroangiopathie wird ein initialer Endothelschaden als notwendige Voraussetzung für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten, insbesondere an Stellen, an denen die Basalmembran freiliegt, angenommen [25]. Eine gesteigerte Aggregationstendenz der Thrombozyten wird von verschiedenen Autoren als Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen diskutiert [14, 15]. Bei Diabetikern, vor allem bei Diabetikern mit Gefäßkomplikationen konnte wiederholt eine erhöhte Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber aggregationsauslösenden

Substanzen wie ADP, Adrenalin oder Kollagen nachgewiesen werden [25, 50, 87].

Es wurde wiederholt diskutiert, daß die Stoffwechselstörung des Diabetikers für die in vitro veränderte Thrombozytenaggregation verantwortlich sein könnte [56, 78, 81]. Die Ergebnisse in der Literatur sind jedoch größtenteils widersprüchlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluß der Diabeteseinstellung auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten zu untersuchen. Die Patientenkollektive wurden dabei nach den Kriterien Diabetesform (juvener Diabetes mellitus (Typ I) - Erwachsenen-Diabetes mellitus (Typ II)), Diabetestherapie (Insulin - orale Antidiabetika) und Qualität der Stoffwechseleinstellung (ketoazidotisches Coma - schlechte, nicht ketoazidotische Einstellung - verbesserte Stoffwechselkontrolle) in verschiedene Gruppen eingeteilt. Zur Beurteilung der Diabeteseinstellung dienten Bestimmungen der Blutglucosekonzentration sowie Messungen des glykosylierten Hämoglobins HbA_1 . Außerdem wurde der Einfluß des bei Diabetikern häufig gestörten Lipidstoffwechsels auf die Thrombozytenreaktivität untersucht. Neben Kohlenhydrat- bzw. Lipidstoffwechsel wurde bei den Untersuchungen die Diabetesdauer mitberücksichtigt.

Aus den in vitro durchgeführten Aggregations-tests sollten durch Messungen des β -Thromboglobulins Hinweise auf die Thrombozytenaktivität in vivo gewonnen werden.

Um einen Beitrag zur Klärung der biochemischen Basis der Thrombozytenreaktivität zu leisten, sollte die cAMP-Konzentration im PRP vor und nach Inkubation mit PGI_2 gemessen und somit Rückschlüsse auf die Aktivität der thrombozytären Adenylatzyklase gezogen werden, da dieses Enzym den Angriffspunkt des kürzlich entdeckten Prostaglandins PGI_2 (Prostacyclin) darstellt.

2. Theoretische Vorbemerkungen: Thrombozytenphysiologie

Die Aggregation gesunder Thrombozyten spielt beim Ablauf der Hämostase eine wichtige Rolle: Bei Kontakt der Thrombozyten mit subepitheliale Gewebe stellt die Adhäsion und darauffolgende Aggregation den ersten Schritt der Hämostase dar. Dabei sezernieren aktivierte Thrombozyten aus cytoplasmatischen Granula Inhaltsstoffe, die den Vorgang der Hämostase beeinflussen; Thrombozytenaggregation und plasmatische Gerinnung sind ineinandergreifende Prozesse. Die Verformbarkeit der Thrombozyten sowie ihre sekretorischen Funktionen im Hämostasemechanismus werden durch eine große Anzahl kontraktile Elemente ermöglicht [40, 93]. Die Thrombozyten verfügen über einen ungewöhnlich intensiven Energiestoffwechsel, der für die Plättchenfunktionen Aggregation - Sekretion - Retraktion von grundlegender Bedeutung ist. Die Glykolyserate ist beispielsweise 13 mal so hoch wie die der Erythrozyten [60]. Energie wird im wesentlichen aus dem gespeicherten Glykogen und aus Glucose bereitgestellt; der Abbau erfolgt sowohl über aerobe Oxidation als auch über die anaerobe Glykolyse [9, 20].

Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten ist offenbar nicht unerheblich vom Alter der Plättchen abhängig [36, 59]. Junge Thrombozyten sind 2 bis 5 mal so stoffwechselaktiv wie ältere [58]. In diesem Zusammenhang ist bei einem konstant erhöhten Thrombozytenumsatz mit einer erhöhten Zahl besonders funktionstüchtiger Plättchen zu rechnen.

2.1 Induzierte Aggregation

Bringt man ADP in plättchenreiches Plasma ein, so setzt innerhalb von Sekunden eine Thrombozytenaggregation ein. Während der ersten Phase (primäre Aggregation) ändern die Thrombozyten ihre Form: Pseudopodien werden ausgestülpt, die Plättchen schwellen an, ihre Oberfläche bekommt ein stacheliges Aussehen. Gleichzeitig wird an die Oberfläche Fibrinogen angelagert, das die Thrombozyten untereinander bindet. Dieser Vorgang ist bei niedrigen ADP-Konzentrationen (0.5, 1.0 μM) reversibel. Bei höheren Konzentrationen (2.0, 5.0, 10.0 μM) laufen zunächst dieselben Vorgänge ab, zusätzlich bewirkt eine verstärkte Freisetzung von Plättcheninhaltsstoffen eine Intensivierung der Thrombozytenaggregation (sekundäre Aggregation) [96].

Adrenalin induziert eine Aggregation der Thrombozyten durch Bindung an α -Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche [70]. Zur Auslösung der Thrombozytenaggregation und Thrombozytensekretion in vitro sind Mikromolar-Konzentrationen Adrenalin erforderlich, die jedoch in vivo nicht erreicht werden. Dennoch wurde die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation in vitro als Maß der Aggregabilität verwendet. Bei Zugabe von Kollagen setzt die Aggregation erst nach einer Verzögerung ein. Bestimmte Glykoproteine an der Oberfläche der Thrombozyten lagern sich an Kollagen an [96]. Diese Verbindung führt zu einer Sekretion von Plättcheninhaltsstoffen, die die Aggregation einleiten.

2.2 β -Thromboglobulin

Die während der Freisetzungsreaktion der Thrombozyten sezernierten Substanzen werden eingeteilt in kleinemolekulare (z.B. ADP, Calcium-Ionen, Serotonin) und großmolekulare (Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Plättchenwachstumsfaktor) Plättcheninhaltsstoffe.

β -TG wurde 1975 erstmals isoliert [69]; es handelt sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 36.000, das aus vier identischen Untereinheiten besteht, deren Primärstruktur aufgeklärt ist [7]. Unter den plättchenspezifischen Proteinen nimmt es den verhältnismäßig größten Anteil ein. Die Plasma-Halbwertszeit beträgt ungefähr 100 Minuten. Es wird durch glomeruläre Filtration aus der Zirkulation entfernt und wahrscheinlich teilweise in den Nierentubuli abgebaut. Über die biologische Funktion des β -TG ist bis jetzt noch wenig bekannt. Es wird angenommen, daß erhöhte Spiegel auf eine erhöhte Freisetzung in vivo und auf einen vermehrten Thrombozyten-Umsatz hinweisen [64].

2.3 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Es wurde diskutiert, daß für das Aggregationsverhalten der Thrombozyten der intrathrombozytäre cAMP-Spiegel verantwortlich ist [88, 90]. Die Synthese des cAMP erfolgt über die membranständige Adenylatzyklase [90, 114], der Abbau über die Phosphodiesterase. Eine Erhöhung der intrathrombozytären cAMP-Konzentration wird entweder durch Stimulation der Adenylatzyklase (Prostaglandine) oder durch Hemmung der Phosphodiesterase (Xanthinkörper wie Coffein oder Theophyllin) erreicht.

Das aus den Gefäßendothelien stammende Prostaglandin Prostacyclin (PGI_2) ist der potenteste, bisher bekannte Stimulator der Adenylatzyklase [68, 102].

PGI_2 und das in den Thrombozyten gebildete Thromboxan (TXA_2) sind Abkömmlinge der Prostaglandinendoxide (PGG_2 , PGH_2), die über das Enzym Cyclooxygenase aus Arachidonsäure synthetisiert werden [71]. Die biologische Aktivität von PGI_2 ist in jeder Hinsicht der von Thromboxan A_2 entgegengesetzt. PGI_2 führt über eine Erhöhung des intrathrombozytären cAMP-Gehaltes zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation bzw. zu einer Disaggregation von beginnenden Plättchenthromben [30, 38]; TXA_2 beschleunigt die Aggregation durch eine Verminderung der Adenylatzyklase-Aktivität und die daraus folgende Herabsetzung der cAMP-Synthese. Moncada stellte die Theorie auf, daß die Regulation der Thrombozytenaggregation auf einem Gleichgewicht zwischen dem thromboxanbildenden System in den Plättchen und der Prostacyclin-Synthese im Gefäßendothel beruht [68]. Einige Untersuchungen ergaben eine verminderte Prostaglandin-Synthese der GefäßEndothelien bei Diabetikern [53, 97] und eine erhöhte Thromboxan-Produktion in den Plättchen unter ADP-Einfluß [113]. Doch blieben diese Ergebnisse nicht unwidersprochen [29].

3. Patientenkollektive

Insgesamt wurden 63 Diabetiker während ihres stationären Aufenthaltes im Krankenhaus München - Schwabing untersucht: 16 ketoazidotische Diabetiker (Gruppe I) und 47 nichtketoazidotische Diabetiker (Gruppen II und III) mit konstanten Nüchternblutzuckerwerten über 300 mg/dl zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme.

Die Patientengruppe I umfaßte 16 ketoazidotische Diabetiker, die in der Coma-Intensivstation des Krankenhauses behandelt wurden. Das Alter der Patienten betrug 17-51 Jahre. Ursache der Stoffwechselentgleisung war überwiegend ein vom Patienten verschuldetes Absetzen der Insulinbehandlung. Bei allen Patienten kam ein einheitliches Coma-Therapieschema mit einer angepaßten Insulinzufuhr zur Anwendung [83]. Die durchschnittliche Blutglucosekonzentration betrug bei Aufnahme in die Klinik 745 ± 149 mg/dl und fiel im Verlauf der Therapie auf 516 ± 78 mg/dl nach 4 Stunden, auf 237 ± 32 mg/dl nach 24 Stunden und auf 217 ± 22 mg/dl nach 120 Stunden. Bei allen Patienten konnten anfänglich halbquantitativ deutliche Mengen an Ketonkörpern im Urin nachgewiesen werden. Zu Beginn der Comatherapie fand sich eine ausgeprägte metabolische Azidose: Die durchschnittliche Bicarbonatkonzentration im Plasma betrug anfänglich 3.9 ± 1.0 mmol/l, nach 24 Stunden 19.4 ± 1.7 mmol/l und nach 120 Stunden 20.9 ± 0.9 mmol/l.

In der Patientengruppe II (24 Patienten) waren ausschließlich insulinpflichtige, nicht-ketoazidotische Diabetiker mit einer mittleren Diabetesdauer von 7.7 Jahren (0.5 - 20 Jahre) vertreten. Das Durchschnittsalter betrug 32.8 Jahre (15 - 66 Jahre). Bei fünf Patienten lag eine diabetische Retinopathie unterschiedlichen Ausmaßes vor, die ophthalmoskopisch diagnostiziert und nach Ballantyne klassifiziert wurde

(Stadien I-IV) |4|. Zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes lagen die Nüchternblutzuckerwerte durchschnittlich bei 345 ± 13 mg/dl. In einem Zeitraum von 10-14 Tagen wurde unter adäquater Insulintherapie eine deutliche Senkung der Blutzuckerwerte auf 171 ± 9 mg/dl erreicht.

Die Patientengruppe III setzte sich aus 23 Patienten zusammen, die bis zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung mit oralen Antidiabetika behandelt wurden. Das Durchschnittsalter betrug 64.4 Jahre (48-83 Jahre), die durchschnittliche Diabetesdauer 12.6 Jahre (4-21 Jahre). Eine Retinopathie Grad I-II wurde in sieben Fällen ophthalmoskopisch nachgewiesen. Der durchschnittliche Blutzuckerwert betrug bei Aufnahme in die Klinik 375 ± 14 mg/dl. Während des stationären Aufenthaltes erfolgte in 21 Fällen eine Umstellung auf Insulinbehandlung, in zwei Fällen konnte die Therapie mit oralen Antidiabetika fortgesetzt werden. Nach einer 14-tägigen Behandlung wurde eine Senkung der Blutzuckerwerte auf 185 ± 10 mg/dl erzielt.

Alle Patienten, die unter Medikamenten standen, die einen nachgewiesenen Einfluß auf die Thrombozytenfunktion zeigten, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Ein Teil der älteren Patienten (Gruppe III) stand jedoch unter Digitalis- und antihypertensiver Therapie, die für die Plättchenstudie nicht ausgesetzt werden konnte.

4. Methodik

4.1 Thrombozytenaggregation

4.1.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma

Mit einer großlumigen Kanüle wurde Venenblut in einer Kunststoffspritze, die eine 3.8-prozentige Natriumcitratlösung enthielt, aufgezogen. Das Mischungsverhältnis betrug 1:10. Nach gründlicher Durchmischung mit dem Antikoagulans wurde das Blut in Plastikröhrchen gefüllt. Durch zehnminütiges Zentrifugieren mit 100 g bei Zimmertemperatur wurde plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer die Thrombozytenzahl pro Kubikmillimeter bestimmt. Plättchenarmes Plasma (PAP) wurde durch zweiminütiges Zentrifugieren des PRP bei 10.000 g gewonnen. Durch Verdünnung des PRP mit PAP wurden alle Proben auf 200.000 Thrombos pro Kubikmillimeter eingestellt.

4.1.2 Aufzeichnung der Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregationen wurden in einem Universalaggregometer der Fa. Braun-Melsungen durchgeführt. Dieses Gerät vereinigt das von Born [11] und O'Brien [73] beschriebene Verfahren zur Messung der induzierten Aggregation mit dem von Breddin [13] entwickelten Plättchenaggregationstest (PAT III). Das Aggregometer war an ein Eppendorf - Photometer adaptiert; verwendet wurde das Filter 546 nm.

Änderungen der optischen Dichte des Plasmas durch Aggregatbildung wurden durch einen angeschlossenen Kompensationsschreiber fortlaufend aufgezeichnet.

Zur Durchführung der ADP-, Adrenalin- bzw. Kollagen - *induzierten Aggregation* wurden Kunststoffröhrchen in den Strahlengang des Photometers gebracht.

Die Durchmischung des PRP erfolgte durch einen Rührmagneten mit 800 U/min. In konstanter Reihenfolge wurden folgende Aggregationstests aufgezeichnet:

ADP: 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 μM

Adrenalin: 0.5 μM

Kollagen: 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 1 und 2)

Zur Durchführung der *spontanen Aggregation* diente eine Scheibenküvette, die sich im Strahlengang des Photometers mit 20 U/min drehte. Entscheidend für die Auslösung der Aggregation ist der während der Rotation erfolgende Anstieg des Plasma-pH durch Austritt von CO_2 . Dieser Vorgang ist die entscheidende Voraussetzung für die "spontane" Aggregation, jedoch nicht deren Ursache [13]. Das Ausmaß des pH-Anstiegs ist in aggregierenden und nichtaggregierenden Plasmen gleich groß, umgekehrt hängt die Stärke der Aggregation nicht vom Ausmaß des pH-Anstiegs ab.

Der Aggregationsvorgang (induzierte und spontane Thrombozytenaggregation) erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37° C (Abb. 3).

4.1.3 Auswertung der Aggregationskurven

Die bei 10.0 μM ADP ausgelöste Aggregation wurde als Maximalaggregation bezeichnet und die zugehörige Extinktionsdifferenz mit 100 Prozent gleichgesetzt. Die durch 0.5, 1.0 und 2.0 μM ADP sowie durch 0.5 μM Adrenalin und 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen induzierten Aggregationen wurden nach vierminütiger Aufzeichnung entsprechend ihren Extinktionsdifferenzen prozentuell gegenüber der Maximalaggregation ausgedrückt.

Extinktion

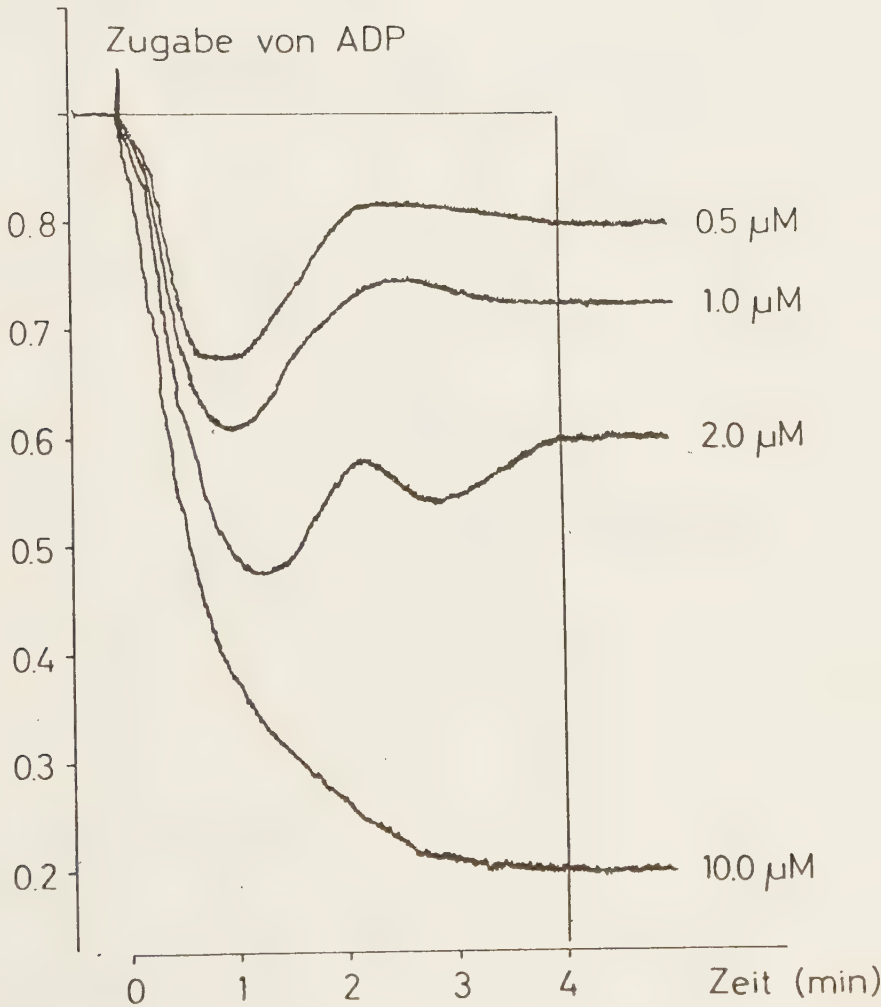


Abb. 1: Kurvenbeispiele für ADP-induzierte Aggregationen

Extinktion

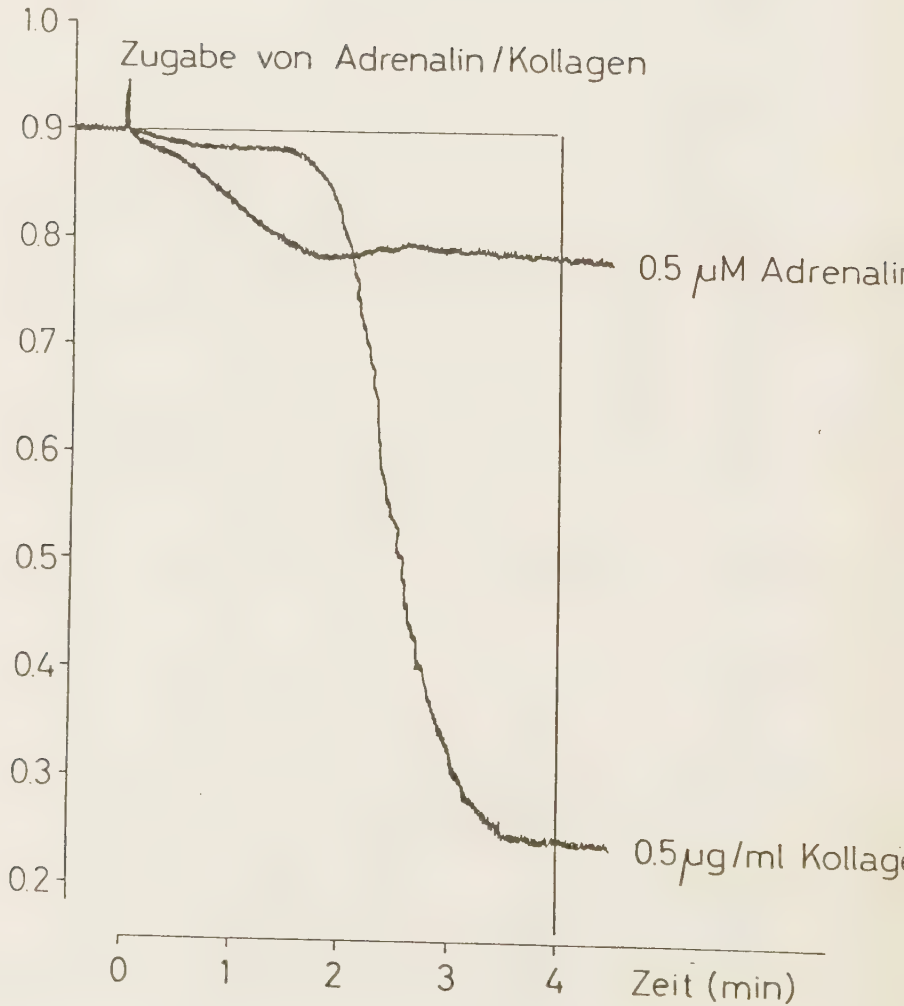


Abb. 2: Kurvenbeispiele für eine Adrenalin- bzw. Kollagen- induzierte Aggregation

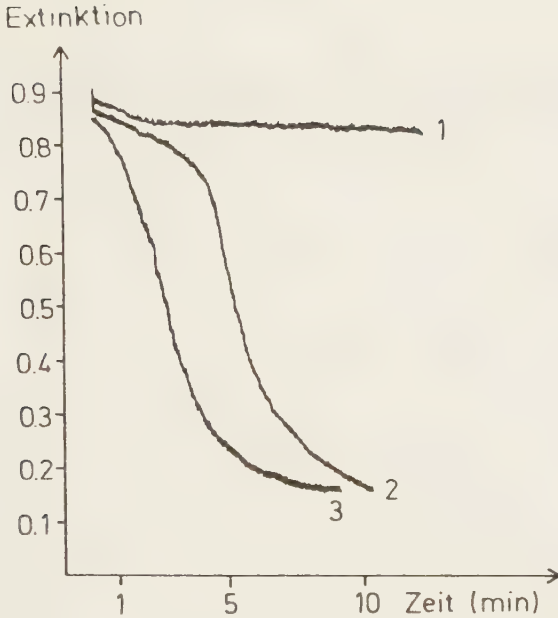


Abb. 3: Kurvenbeispiele für Spontanaggregationen: (1) fehlende Aggregation, (2) und (3) maximal gesteigerte Aggregation

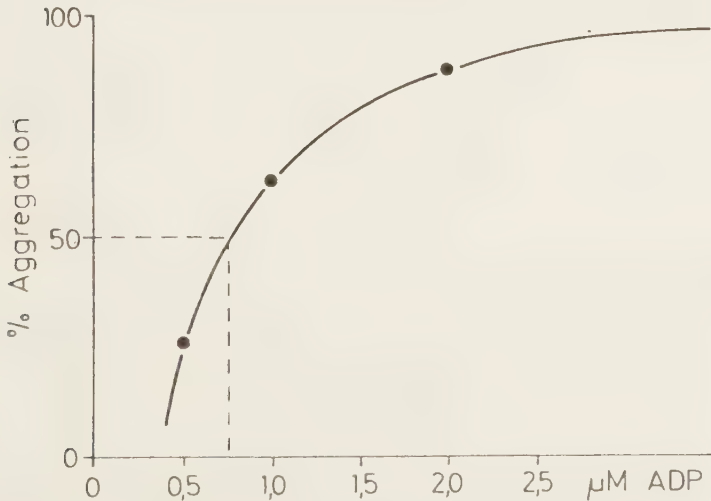


Abb. 4: Graphische Ermittlung der 50 % Aggregation ("Schwellenkonzentration"). Die im Beispiel dargestellten Punkte geben die prozentuale Veränderung der optischen Dichte an, die durch eine bestimmte ADP-Konzentration im PRP nach 4 min erreicht wurde.

Rechenbeispiel

(Vgl. Kurvenbeispiele für ADP-, Adrenalin- und Kollagen - induzierte Thrombozytenaggregationen; Abb. 1 und 2)

10.0 μM ADP :	0.7 E =	100 %	(Maximalaggregation)
0.5 μM ADP :	0.1 E =	14 %	
1.0 μM ADP :	0.17 E =	24 %	
2.0 μM ADP :	0.3 E =	43 %	
0.5 μM Adrenalin :	0.11 E =	16 %	
0.5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen :	0.65 E =	93 %	

Als Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten wurde diejenige ADP-Konzentration bezeichnet, die 50 % der maximalen Thrombozytenaggregation induzierte (50 %-Aggregation oder auch als Schwellenkonzentration bezeichnet). Die Ermittlung dieses Wertes erfolgte graphisch in Form einer Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4). Durch Zuordnung der Reziprokwerte erhält man ein Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 5). Diese Methode ermöglichte eine lineare Zuordnung zwischen ADP-Endkonzentration und dem hierdurch induzierten Ausmaß der Thrombozytenaggregation. Die ADP-Konzentration, die zur Auslösung einer 50 % - Aggregation nötig wäre, konnte sowohl graphisch direkt aus dem Lineweaver-Burk - Diagramm als auch rechnerisch durch Aufstellung einer Geradengleichung bestimmt werden.

Bei der *spontanen Thrombozytenaggregation* wurden folgende Parameter erfaßt:

1. Winkel α_1 , gebildet aus der Waagerechten und der Tangente zur beim Start der Rotation relativ flach verlaufenden Transmissionskurve. Winkel α_1 entspricht der "primären Aggregation".
2. Winkel α_2 , gebildet aus der Waagerechten und der Tangente zum steilsten Teil des Kurvenabfalls ("sekundäre Aggregation").

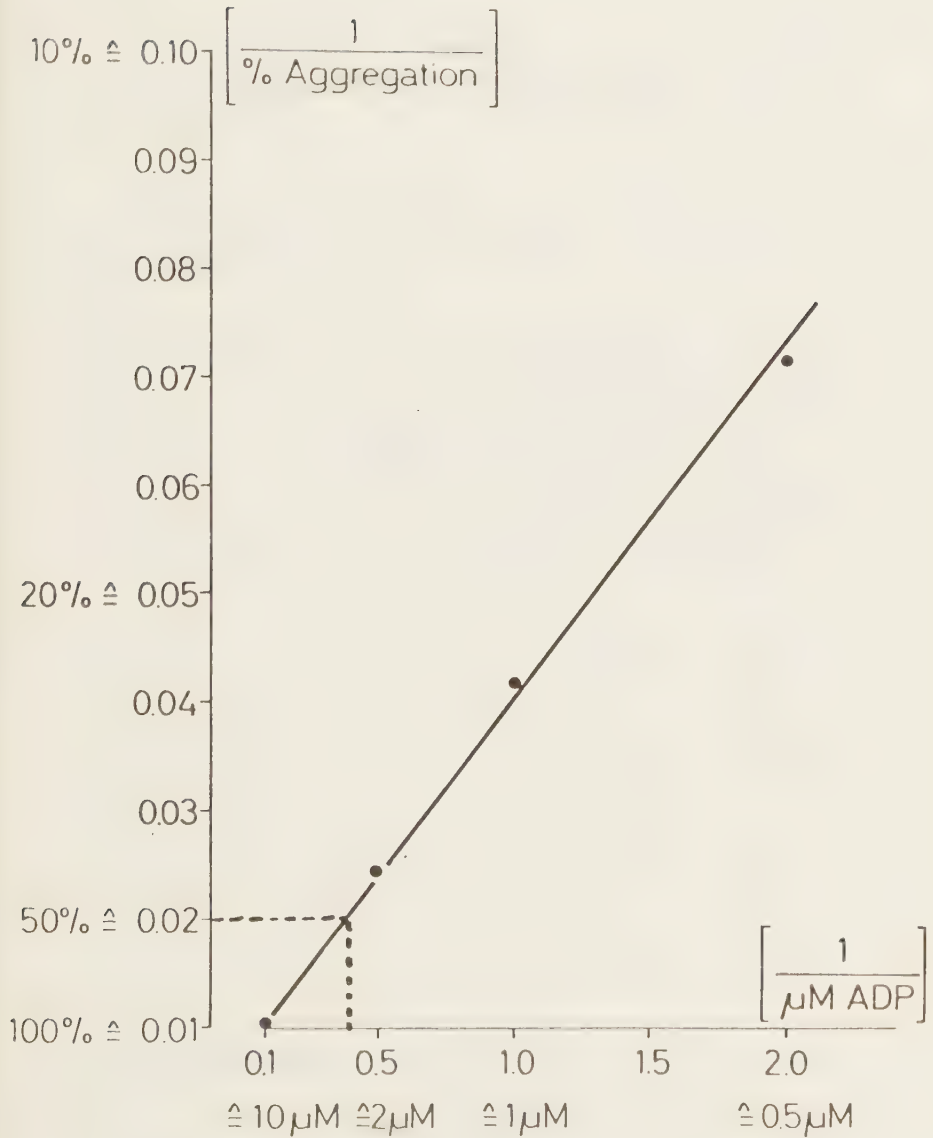


Abb. 5: Lineweaver-Burk-Diagramm: Reziprokwerte der ADP-Konzentrationen und Reziprokwerte der in Prozent ausgedrückten Aggregationen. Ermittlung der ADP-Konzentration, die eine "50%-Aggregation" auslöst; Werte des Rechenbeispiels aus Abschnitt 3.1.3

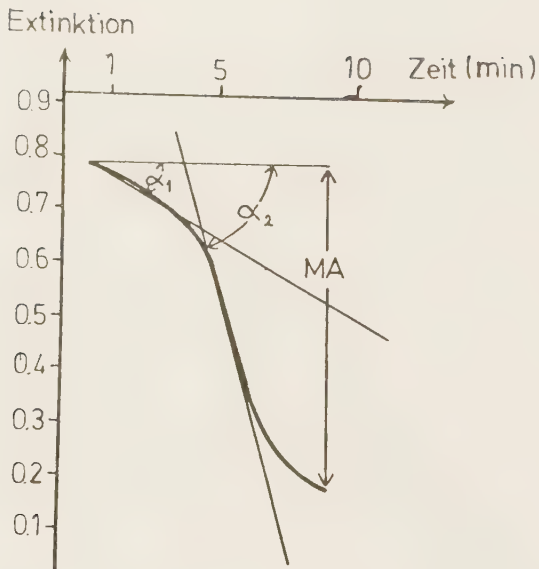


Abb. 6: Auswertung der Kurve einer spontanen Aggregation (vgl. Text)

3. Die Maximalamplitude (MA) als Differenz zwischen der Ausgangstransmission und der maximalen Transmission (Abb. 6).

4.2 Zyklisches AMP (cAMP) im plättchenreichen Plasma

4.2.1 Inkubation

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte im PRP (200.000 Thrombos/mm³), dessen Herstellung im Abschnitt "Messung der Thrombozytenaggregation" beschrieben wurde. Auf die Separierung von Thrombozyten wurde wegen der hohen Verlustrate von thrombozytärem cAMP bei der Zentrifugation verzichtet [89]. Außerdem sollten sich die Plättchen bei den Inkubationen in einem möglichst physiologischen Milieu befinden.

In vier Polyäthylenröhrchen (1-4) wurde je 1 ml PRP pipettiert und in den Eppendorf-Inkubator bei 37° C eingesetzt. PRP in Röhrchen 3 und 4 wurde mit je 0.28 µM Prostacyclin (PGI₂), Röhrchen 4 zusätzlich mit 1 µM Isobutyl-methyl-Xanthin (IBMX) (Endkonzentration) inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgte nach einer Minute durch Zugabe von 0.2 ml 30-prozentiger TCA. Die Proben 1 und 2 (basale cAMP-Konzentrationen) wurden ebenfalls mit 0.2 ml 30-prozentiger TCA gefällt. Die durch die Inkubationen sich ergebenden unterschiedlichen Volumina wurden bei den Berechnungen berücksichtigt.

4.2.2 Extraktion von cAMP

Nach der Trichloressigsäurefällung wurde jede Probe durch Sonifikation bei 0° C 30 Sekunden lang homogenisiert und anschließend bei 2° C mit 5.000 g 15 Minuten lang zentrifugiert (Sorval). 0.5 ml des klaren Über-

standes wurden mit 0.02 ml 1n HCl versetzt und die TCA durch fünfmaliges Waschen mit Diäthyläther (Volumenverhältnis 1:7) entfernt. Die Proben wurden danach neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Trockenpulver wurde zur cAMP-Bestimmung in 0.2 ml (Basal-cAMP) bzw. 1.0 ml (stimuliertes cAMP) Tris (0.05 M) - EDTA (4 mM) - Puffer, pH 7.5, gelöst und das pH in jeder Probe kontrolliert.

4.2.3 cAMP - Messung

Die Messung des cAMP-Spiegels wurde mit einem kommerziellen Proteinbindungs-assay von "The Radiochemical Centre Amersham" durchgeführt.

Das Prinzip dieser Testmethode basiert auf der Konkurrenz von unmarkiertem und Tritium-markiertem (^3H)-cAMP um die Rezeptorstellen eines spezifischen Bindungsproteins mit hoher Affinität für cAMP [37]. Der Anteil des proteingebundenen radioaktiven cAMP ist der Konzentration an nicht-markiertem cAMP umgekehrt proportional.

Das nichtgebundene cAMP wird durch Adsorption an Aktivkohle von dem proteingebundenen Anteil abgetrennt. Nach Zentrifugation wird ein Teil des Überstandes zur Zählung im Liquid-Szintillation-Counter abgenommen. Linearität und Steigung der Eichkurve des Tests (Abb. 8) und damit Sensibilität und Meßbereich sind vor allem von der Konzentration des Tracers und des Bindungsproteins abhängig. Die Linearität der Eichkurve im logarithmischen Koordinatensystem wird erreicht, wenn die Konzentration von (^3H) - cAMP im Testansatz die Gesamtbindungskapazität des spezifischen Bindungsproteins um 60% überschreitet. Die Steigung der Kurve wird durch das Verhältnis (^3H) - cAMP zu nicht-markiertem cAMP festgelegt. Der Bereich der höchsten

Röhrchen Nr	Blank		Nullwert		Standards										Proben			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pufferlösung	150	150	50	50														
1 pmol cAMP					50	50												
2 pmol cAMP							50	50										
4 pmol cAMP									50	50								
8 pmol cAMP											50	50						
16 pmol cAMP													50	50				
Probe 1																50	50	
Probe 2																	50	50
cAMP(³ H)	← 50 →																	
Bindungsprotein	← 100 →																	

Alle Volumina in µl

Abb. 7: Pipettierschema des cAMP (³H) Radioassay Kit

Zählrate der Standards/Proben
Blankzählrate

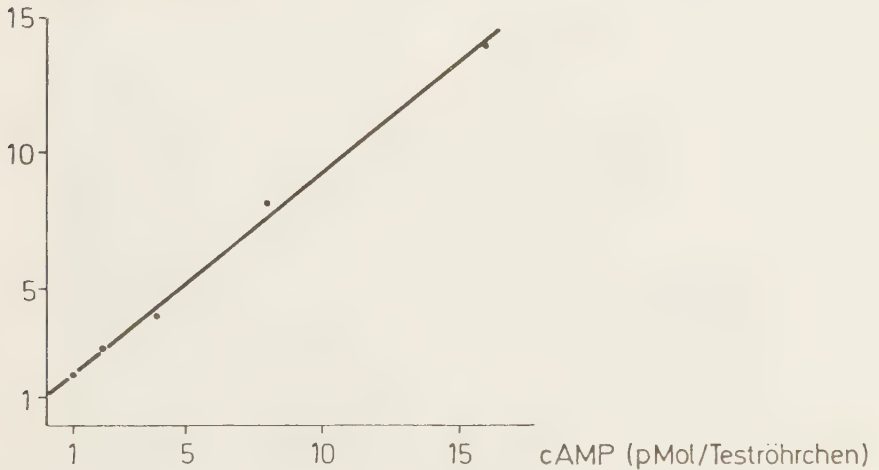


Abb. 8: typische cAMP-Eichkurve

Meßgenauigkeit liegt demnach im Konzentrationsbereich des Tracers; hohe Sensitivität wird durch kleine Tracer-Mengen, großer Meßbereich mit hohen Tracer-Mengen erreicht.

Die Testsubstanzen wurden in der in Abb. 7 angegebenen Menge und Reihenfolge in Eppendorf-Cups (1.5 ml), die in eisgekühlten Metallblöcken gelagert waren, pipettiert. Nach Reaktionsstart durch Zugabe der Bindungsproteinlösung wurden alle Proben 5 Sekunden geschüttelt und danach für 2 Stunden zur Äquilibration der Bindungsreaktion bei 4° C aufbewahrt. Anschließend wurde 0.1 ml einer eisgekühlten Kohlesuspension dazugegeben und 10 Sekunden auf dem Schüttelmixer gemischt. Gleich danach wurden alle Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. 0.2 ml Überstand wurden abgenommen, in 10 ml Szintillationsmedium (Roth) pipettiert und die Aktivität gemessen

4.3 β - Thromboglobulin

Um tatsächlich ausschließlich das in vivo freigesetzte β -TG zu bestimmen, mußte die Blutentnahme so erfolgen, daß eine in-vitro-Freisetzung weitgehend vermieden wurde. Eine Vene wurde ohne Vorstauung mit einer weatlumigen Kanüle anpunktiert; die ersten 10-15 ml wurden für andere Untersuchungen verwendet; 2 ml Vollblut wurden unmittelbar nach Entnahme in einem mit einer antikoagulierend wirkenden Lösung beschichteten Röhrchen vorsichtig durchmischt (Antikoagulans aus Na-EDTA, Prostaglandin E_1 und Theophyllin). Die Proben wurden sofort in ein Eisbad gestellt und anschließend bei 2-4° C 30 Minuten lang mit 2.000 g zentrifugiert. 1.0 ml des Überstandes wurde in ein Plastikröhrchen pipettiert und bis zur Analyse bei -20° C eingefroren.

	Standards					Proben	
Röhrchen Nr.	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14 etc.
10 ng β-TG	50 50 50 50						
20 ng β-TG							
50 ng β-TG							
100 ng β-TG							
225 ng β-TG							
Proben je						50	50
(¹²⁵ J)β-TG	200	200	200	200	200	200	200
Anti β-TG Serum	200	200	200	200	200	200	200
Ammoniumsulfat	500	500	500	500	500	500	500

(alle Volumina in ml)

Abb. 9: Pipettierschema für (^{125}J) β -TG Radioimmunoassay

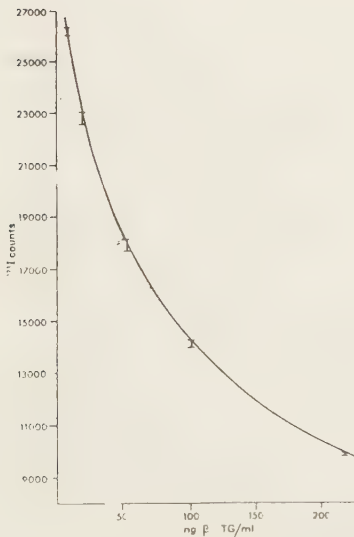


Abb. 10: typische β -TG-Eichkurve

Zur Bestimmung der β -TG-Konzentrationen wurde der Test-Kit der Fa. Amersham verwendet: Bei diesem kompetitiven Radioimmunoassay konkurriert das nicht-radioaktive Protein im Plasma mit einer konstanten Menge zugesetzten ^{125}J -markierten Proteins um Bindungsstellen einer begrenzten Menge β -TG-Antikörper. Somit ist der Anteil an radioaktivem Protein, das an Antikörper gebunden ist, umgekehrt proportional der Konzentration an nicht-radioaktiven Protein der Probe. Das an Antikörper gebundene β -TG (radioaktives und nichtradioaktives β -TG) wird mit Hilfe einer Ammoniumsulfatlösung präzipitiert. Die Radioaktivität im Präzipitat wird mit einem Gamma-zähler gemessen. Die β -TG-Konzentration der Probe wurde durch Vergleich mit Standards graphisch ermittelt (Pipettierschema s. Abb. 9; typ. Eichkurve s. Abb. 10).

4.4 Beurteilung der Diabeteseinstellung

4.4.1 Glykosyliertes Hämoglobin HbA₁

Da die Konzentration des glykosylierten Hämoglobins eine gute Korrelation mit dem Blutzuckerspiegel zeigt und vermutlich ein "Integral" der Blutzuckerwerte eines längeren Zeitraums darstellt [34], hat sich die Bestimmung des HbA₁ als wertvolle Methode zur Beurteilung der Stoffwechselkontrolle des Diabetikers erwiesen.

Die Hämoglobinglykosylierung wurde nach dem von Flückiger und Winterhalter beschriebenen colorimetrischen Verfahren [31] bestimmt: Durch Katalyse mit Oxalsäure, die die Amadori-Reaktion fördert, wird die Entstehung der Ketoaminform begünstigt. Bei anschließendem Erhitzen auf 100° C entsteht durch Dehydrierung 5-Hydroxy-methylfurfural (5-HMF), welches mit Thiobarbitursäure einen gelben Komplex bildet. Mehrere Untersuchungen bestätigen eine hohe Korrelation der Meßergebnisse des colorimetrischen Tests mit Resultaten aus anderen Verfahren (Säulenchromatographie [76]).

Die Blutproben wurden mit 3.8-prozentigem Natriumcitrat im Verhältnis 1:10 durchmischt. Durch dreimalige Zugabe von isotoner Kochsalzlösung und anschließendem Zentrifugieren bei 1.000 g (10 min) wurden die Erythrozyten gewaschen. Nach Hämolyse mit Tetrachlorkohlenstoff wurde der Hämoglobingehalt bestimmt. Durch Verdünnung mit destilliertem Wasser wurden alle Proben auf eine Hb-Konzentration von 10 g % eingestellt. Nach Zugabe von 0.5 ml 0.3n Oxalsäure zu 1 ml Hämolysat wurden die Röhrchen kräftig geschüttelt und anschließend eine Stunde lang auf 100° C erhitzt. Nach Abkühlung wurde 0.5 ml 40-prozentige TCA zugegeben und 10 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Ein Milliliter des Überstandes wurde mit 250 µl 0.05 M Thiobarbitursäure gemischt und 40 Minuten bei 38° C inkubiert. Anschließend konnten die Extinktionswerte im Photometer bei 436 nm abgelesen werden. Durch Messung der Extinktionen konnten die jeweiligen 5-HMF-Konzentrationen bzw. der prozentuelle Anteil des glykosylierten Hb's am Gesamt-Hb ermittelt werden.

4.4.2 Blutzucker, Blutfette

Blutglucose, Serumcholesterin und -triglyzeride wurden enzymatisch nach Standardmethoden (Boeringer-Mannheim-Kit) durchgeführt. HDL-Cholesterin wurde aus dem Serum nach Fällung mit Manganchlorid und Phosphorwolframsäure ermittelt.

4.5 Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten in den meisten Fällen mit dem t-Test für unverbundene Stichproben. Für die Daten der Kollagen-induzierten Aggregationen sowie für die statistische Erfassung der Triglyzerid-, Gesamtcholesterin- und HDL-Cholesterin-Werte wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Angegeben wurden der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung S.E.M. (standard error of mean). Darüberhinaus wurden Korrelationsberechnungen zur Schätzung des Korrelationskoeffizienten r und der Regressionsgeraden angefertigt.

5. Ergebnisse

5.1 Thrombozytenaggregation

5.1.1 Comastudie (Gruppe I)

Im Vergleich zu späteren Kontrollen waren die ADP-, Adrenalin- und Kollagen - induzierten Thrombozytenaggregationen in der Ketoazidose deutlich vermindert. Die rechnerisch ermittelte, zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation notwendige ADP-Konzentration sank von $4.1 \pm 1.6 \mu\text{M}$ bei Behandlungsbeginn auf $2.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$ nach 4 Stunden. Nach 24 Stunden wurden $1.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ADP und nach 120 Stunden nur noch $0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ADP benötigt ($p < 0.01$). Gemessen an der zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation notwendigen ADP-Menge, nahm die Thrombozytenaggregation in dem Zeitraum von Behandlungsbeginn und 120 Stunden danach um das 4 bis 5-fache zu.

$0.5 \mu\text{M}$ ADP induzierte in der Ketoazidose durchschnittlich nur $5.0 \pm 2.0 \%$, nach 120 Stunden jedoch $31.6 \pm 9.2 \%$ der maximal möglichen Aggregation (nach 4 Std.: $8.7 \pm 2.5 \%$, nach 24 Std.: $23.6 \pm 5.0\%$). Die doppelte ADP-Konzentration ($1.0 \mu\text{M}$) bewirkte zunächst $16.7 \pm 3.7 \%$, nach 4 Stunden $22.9 \pm 4.6 \%$, nach 24 Stunden $46.9 \pm 7.6 \%$ und nach 120 Stunden $54.6 \pm 7.1 \%$.

Die mit $2.0 \mu\text{M}$ ADP induzierten Aggregationen stiegen von $23.7 \pm 5.7 \%$ bei Behandlungsbeginn auf $31.1 \pm 17.1 \%$ nach 4 Stunden; nach 24 Stunden betrugen sie durchschnittlich $74.0 \pm 5.9 \%$ und nach 120 Stunden $79.9 \pm 8.3 \%$ der Maximalaggregation (Tabelle 1).

Die Unterschiede zwischen den Adrenalin-induzierten Aggregationen waren ebenfalls signifikant: $10.2 \pm 1.5 \%$ in der Ketoazidose, $24.7 \pm 4.9 \%$ nach 4 Stunden, $45.8 \pm 8.4 \%$ nach 24 Stunden und $62.1 \pm 8.2\%$ 120 Stunden nach Behandlungsbeginn ($p < 0.01$, Tab. 2).

Tabelle 1: ADP-induzierte Thrombozytenaggregationen
während der Behandlung des diabetischen
Comas ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)
(Gruppe I; n=16)

Zeit	ADP-induzierte Aggregationen			Errechnete 50 % Aggre- gation bei μM ADP
	0.5 μM	1.0 μM	2.0 μM	
Behandlungs- beginn	5.0 $\pm$ 2.0	16.7 $\pm$ 3.7	23.7 $\pm$ 5.7	4.1 $\pm$ 1.6
4 Std.	8.7 $\pm$ 2.5	22.9 $\pm$ 4.6	31.3 $\pm$ 17.1	2.8 $\pm$ 1.0
24 Std.	23.6 $\pm$ 5.0	46.9 $\pm$ 7.6	74.0 $\pm$ 5.9	1.2 $\pm$ 0.2 **
120 Std.	31.6 $\pm$ 9.2	54.6 $\pm$ 7.1	79.9 $\pm$ 8.3	0.9 $\pm$ 0.1 **
Prozent der maximalen Aggregation				

** p < 0,01 vs Behandlungsbeginn

Tabelle 2: Adrenalin- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation während der Behandlung des diabetischen Comas ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)
(Gruppe I; n=16) (Werte in Prozent der maximalen Aggregation)

Zeit	<u>Adrenalin</u> 0.5 μM	<u>Kollagen</u> 0.5 $\mu\text{g/ml}$
Behandlungsbeginn	10.2 $\pm$ 1.5	47.6 $\pm$ 11.6
4 Std.	24.7 $\pm$ 4.9	62.6 $\pm$ 15.4
24 Std.	45.8 $\pm$ 8.4	75.8 $\pm$ 9.0
120 Std.	62.1 $\pm$ 8.2 *	82.7 $\pm$ 6.9 **

* $p < 0,01$

** $p < 0,05$ (Wilcoxon-test)

vs Behandl.beginn

0.5 µg/ml Kollagen bewirkte in der Ketoazidose durchschnittlich $47.6 \pm 11.6 \%$, nach 4 Stunden $62.6 \pm 15.4\%$, nach 24 Stunden $75.8 \pm 9.0 \%$ und nach 120 Stunden $82.7 \pm 6.8 \%$ der maximal möglichen Aggregation.

5.1.2 Typ I Diabetiker (Gruppe II)

In der Gruppe der ausschließlich Insulin-therapierten, nicht-ketoazidotischen Diabetiker (Gruppe II) ergaben sich ähnliche Resultate: Im Vergleich zur zweiten Untersuchung, die nach zweiwöchiger Therapie und weitgehender Normalisierung der Blutglucosekonzentrationen erfolgte, war die mit 0.5, 1.0 und 2.0 µM ADP (Tab. 3) sowie mit 0.5 µM Adrenalin und 0.5 µg/ml Kollagen (Tab. 4) induzierte Thrombozytenaggregation bei schlechter Stoffwechseleinstellung signifikant ($p < 0.05$) vermindert. Die zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation notwendige ADP-Konzentration sank von 1.9 ± 0.2 µM zu Beginn der Studie auf 1.4 ± 0.2 µM bei der 2. Untersuchung ab ($p < 0.05$). Bei 0.5 µM ADP stieg die durchschnittlich induzierte Aggregation von $8.8 \pm 1.6\%$ auf $14.6 \pm 1.8 \%$ der maximal möglichen Aggregation. Bei höheren ADP-Konzentrationen (1.0 µM bzw. 2.0 µM) fand sich ein ähnliches Verhalten (siehe Tabelle 3). Die Ergebnisse der Adrenalin- und Kollagen-induzierten Aggregation zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den ADP-Daten. Ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0.01$) fand sich zwischen den Adrenalin-induzierten Aggregationen der 1. und 2. Untersuchung: Die Werte der Thrombozytenaggregationen stiegen von durchschnittlich $20.7 \pm 1.7 \%$ auf $30.9 \pm 2.5 \%$ an. Die Auswertung der Kollagen-induzierten Aggregationen erfolgte mit dem Wilcoxon-(Vorzeichen-Rang-)Test: Dabei ergab sich ebenfalls eine signifikante Differenz ($p < 0.01$)

Tabelle 3: Veränderungen der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation bei insulinpflichtigen Diabetikern (Gruppe II; n=24)
(Werte in Prozent der max. Aggregation; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)

ADP Konzentrationen [μM]	1. Untersuchung % der maximalen Aggregation	2. Untersuchung maximalen Aggregation	Signifikanz
0.5,	8.8 ± 1.6	14.5 ± 1.8	$p < 0.05$
1.0	15.8 ± 1.9	25.8 ± 3.4	$p < 0.05$
2.0	65.2 ± 4.7	76.9 ± 4.1	$p < 0.05$

Tabelle 4: Veränderungen der Adrenalin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation bei insulinpflichtigen Diabetikern (Gruppe II; n=24)
(Werte in Prozent der max. Aggregation; $\bar{x} \pm$ S.E.M.)

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Signifikanz
0,5 μ M Adrenalin	20.7 $\pm$ 1.7	31.0 $\pm$ 2.5	p < 0.01
0,5 μ g/ml Kollagen	56.7 $\pm$ 7.9	71.0 $\pm$ 6.4	p < 0.01*

(* Wilcoxon-Test)

zwischen den Aggregationen der 1. Untersuchung ($56.7 \pm 7.9 \%$) und der 2. Untersuchung ($71.0 \pm 6.4 \%$).

Das Ausmaß der "spontanen Aggregation" war in allen Fällen sehr gering. Der Winkel α_1 ("primäre Aggregation") betrug durchschnittlich $12.6 \pm 1.5^\circ$ bei der ersten und $17.0 \pm 2.4^\circ$ bei der zweiten Untersuchung. Eine Sekundäraggregation, gekennzeichnet durch einen zweiten Kurvenabfall mit dem Winkel α_2 , trat nur in einem Fall auf. Die Maximalamplitude (MA) betrug durchschnittlich 0.035 (1. Untersuchung) gegenüber 0.041 Extinktionseinheiten (2. Untersuchung).

Bei fünf Patienten der Gruppe II wurde ophthalmoskopisch eine Retinopathie festgestellt. Die Ergebnisse waren gegenüber den Werten von Diabetikern ohne manifeste Mikroangiopathie nicht signifikant unterschiedlich. Zur 50 % - Aggregation wurden bei der 1. Untersuchung durchschnittlich $1.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ADP, nach Normalisierung der Blutglucosewerte nur $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ADP ($p < 0.05$) benötigt (Tabelle 5).

Eine Bestätigung dieser Befunde bot das Verhalten der Thrombozytenaggregation bei der ersten Diabetikerin mit implantiertem Insulindosiergerät und zentralvenösem Zugang [107] (Abb. 11). Die Säulen stellen die mittleren Blutglucosekonzentrationen (mindestens 8 Einzelbestimmungen) dar, die Punkte geben die ADP-Schwellenkonzentration wieder. Mit Senkung der Blutglucose nahm die Thrombozytenaggregation deutlich zu und wurde in der Folgezeit lediglich nach einer Funktionsstörung des Insulindosiergerätes und der damit zusammenhängenden Blutzuckererhöhung vermindert.

Tabelle 5: Aggregationsneigung, beurteilt anhand der eine 50%-Aggregation auslösenden ADP-Konzentration, bei Patienten mit Mikroangiopathie gegenüber dem Gesamtkollektiv (Gruppe II); $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$

	50%-Aggregation (LM ADP)		Signifikanz
	<u>1. Untersuchung</u>	<u>2. Untersuchung</u>	
Patientengruppe II (n = 24)	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.2	$p < 0.05$
Patienten mit Mikroangiopathie (n = 5; aus Gruppe II)	1.9 ± 0.3	1.3 ± 0.3	$p < 0.05$

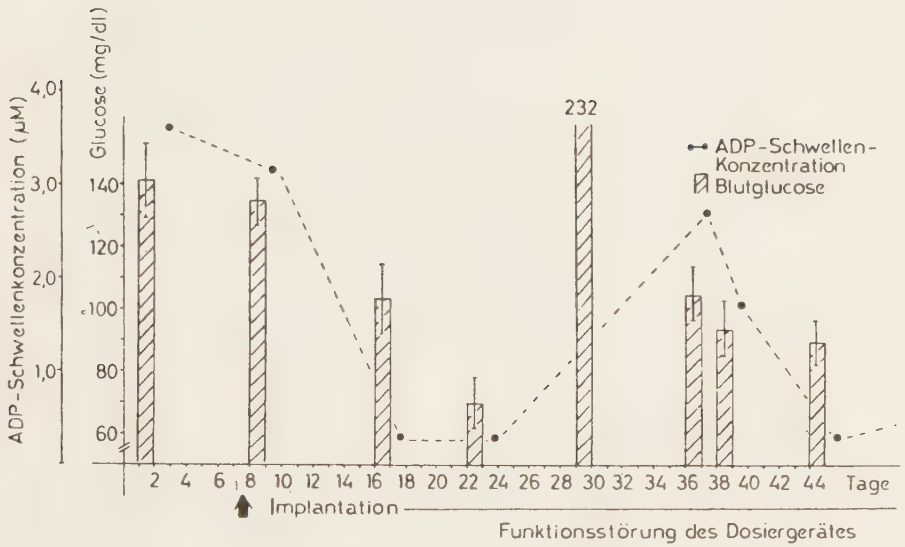


Abbildung 11: Mittlere Blutglucosespiegel ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$) und ADP - induzierte Thrombozytenaggregation bei einer Diabetikerin mit implantiertem Insulindosiergerät.

5.1.3 Typ II-Diabetiker (Gruppe III)

Die Gruppe der Diabetiker, die zunächst mit oralen Antidiabetika behandelt ($n = 23$) und größtenteils während des Krankenhausaufenthalts auf eine Insulintherapie eingestellt wurden ($n = 21$), wick - in der Gesamtheit betrachtet - in den Ergebnissen von den vorgehenden Gruppen ab: Das Aggregationsverhalten der Thrombozyten blieb nahezu unverändert. Die zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation erforderliche ADP-Konzentration betrug bei der ersten Messung durchschnittlich $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ und bei der zweiten Messung $1.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$. Eine $0.5 \mu\text{M}$ ADP-Konzentration induzierte zunächst durchschnittlich $29.8 \pm 5.8 \%$, bei der zweiten Untersuchung $28.1 \pm 5.8 \%$ der maximal möglichen Aggregation. Bei $1.0 \mu\text{M}$ ADP wurden $52.4 \pm 6.6 \%$ gegenüber $54.7 \pm 6.2 \%$, bei $2.0 \mu\text{M}$ ADP $21.5 \pm 4.8 \%$ gegenüber $84.6 \pm 3.9 \%$ gemessen (Tabelle 6). Die Adrenalin-induzierten Aggregationen erhöhten sich geringfügig von durchschnittlich $40.6 \pm 5.7 \%$ auf $49.8 \pm 5.7 \%$. Diese Differenz liegt jedoch nicht im Signifikanzbereich. Die Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen blieben mit $84.5 \pm 4.2 \%$ (1. Untersuchung) gegenüber $88.4 \pm 3.2 \%$ ebenfalls nahezu unverändert (Tabelle 7).

Das Ausmaß der spontan verlaufenden Aggregation war in fast allen Fällen sehr gering. Der Winkel α_1 betrug durchschnittlich $16.1 \pm 1.8^\circ$ vor Therapiebeginn, bzw. $15.3 \pm 2.1^\circ$ bei verbesserter Diabetes-einstellung. Eine Sekundäraggregation (Winkel α_2) wurde bei der ersten Untersuchung in einem Fall, bei der zweiten Untersuchung in drei Fällen registriert. Die Maximalamplitude betrug durchschnittlich 0.076 (1. Untersuchung) gegenüber 0.089 Extinktionseinheiten (2. Untersuchung).

Die Aggregationsdaten der Patienten mit manifester Mikroangiopathie unterschied sich von den Ergebnissen der Gesamtgruppe: Bei diesen Diabetikern

Tabelle 6: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Diabetikern der Gruppe III (n=23)
(Werte in Prozent der maximalen Aggregation; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)

ADP-Konzentration [μM]	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Signifikanz
0.5	29.8 ± 5.8	28.1 ± 5.8	—
1.0	52.4 ± 6.6	54.7 ± 6.2	—
2.0	81.5 ± 4.8	84.6 ± 3.9	—

Tabelle 7: Adrenalin- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation bei Diabetikern der Gruppe III (n=23)
(Werte in Prozent der max. Aggregation; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Signifikanz
0.5 μM Adrenalin	40.6 $\pm$ 5.7	49.8 $\pm$ 5.7	—
0.5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen	84.5 $\pm$ 4.2	88.4 $\pm$ 3.2	—

Tabelle 8: Aggregationsneigung, beurteilt anhand der eine 50%-Aggregation auslösenden ADP-Konzentration, bei Patienten mit Mikroangiopathie gegenüber dem Gesamtkollektiv (Gruppe III); $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$

	50%-Aggregation ($\mu\text{M ADP}$)		Signifikanz
	1. Untersuchung	2. Untersuchung	
Patientengruppe III (n = 23)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	—
Patienten mit Mikroangiopathie (n = 7; aus Gruppe III)	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.2	$p < 0.05$

(n=7) waren ähnliche Unterschiede der Thrombozytenaggregation wie bei den Patientenkollektiven I und II nachweisbar. Zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation wurden bei der ersten Untersuchung $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ADP, bei der zweiten Messung hingegen durchschnittlich nur $0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ADP benötigt ($p < 0.05$, Tabelle 8).

Im Vergleich zu "Normalwerten" der Thrombozytenaggregation, die bei nichtdiabetischen Kontrollpersonen gemessen wurden (Schwellenkonzentration: $1.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ADP [50]), fällt die deutlich erhöhte Schwellenkonzentration in der diabetischen Ketoazidose (Gruppe I) auf (Tabelle 1). Nach Verbesserung der Stoffwechseleinstellung liegen die Schwellenkonzentrationen bei Diabetikern (Gruppen I, II, III) generell niedriger, d.h. die Thrombozyten-Aggregabilität ist erhöht.

5.2 Zyklisches Adenosinmonophosphat

5.2.1 Comastudie (Gruppe I)

Zu Beginn der Coma-Behandlung betrug die basale cAMP-Konzentration im PRP durchschnittlich $78 \pm 9 \text{ pmol/ml}$. Während der Therapie fiel der cAMP-Spiegel kontinuierlich ab: $43 \pm 5 \text{ pmol/ml}$ nach 24 Stunden, $33 \pm 3 \text{ pmol/ml}$ nach 24 Stunden und $29 \pm 4 \text{ pmol/ml}$ nach 120 Stunden. Wurden die PRP-Proben mit konstanten PGI_2 -Konzentrationen ($0.28 \mu\text{M}$) inkubiert, so resultierte ein unterschiedlich starker Anstieg des cAMP-Spiegel: $249 \pm 42 \text{ pmol/ml}$ bei Therapiebeginn, das entspricht dem 3.2-fachen (Faktor 3.2) der basalen cAMP-Konzentration; $229 \pm 62 \text{ pmol/ml}$ nach 4 Stunden (Faktor 5.2); $247 \pm 30 \text{ pmol/ml}$ nach 24 Stunden (Faktor 7.5); $296 \pm 24 \text{ pmol/ml}$ nach 120 Stunden (Faktor 10.2, $p < 0.05$; Tab.9, Abb.12). Der PGI_2 -vermittelte Anstieg der cAMP-Spiegel kann als

Tabelle 9: cAMP-Messungen im PRP während der Behandlung des ketoazidotischen Comas. Basale cAMP-Spiegel, sowie cAMP-Konzentrationen nach Inkubation mit $0,28 \mu\text{M}$ PGI_2 .

n = 16 ketoazidotische Diabetiker			
Zeit	$[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	$[\text{cAMP}]_{\text{PGI}_2}$	Vielfaches von $[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$
Behandlungsbeginn	78 $\pm$ 9	249 $\pm$ 42	3,2
4 Std.	43 $\pm$ 5	229 $\pm$ 62	5,3
24 Std.	33 $\pm$ 3	247 $\pm$ 30	7,5
120 Std.	29 $\pm$ 4	296 $\pm$ 24*	10,2
Werte in pmol/ml; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$			

* $p < 0,05$ vs Behandlungsbeginn

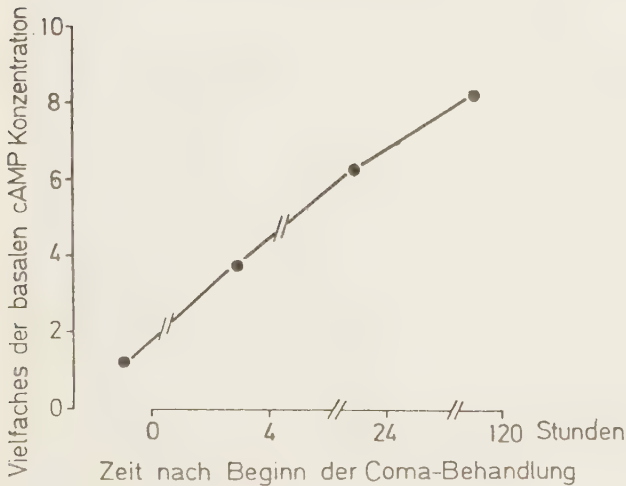


Abbildung 12: Wirkung von $0,28 \mu\text{M}$ PGI_2 auf den Gehalt von cAMP im plättchenreichen Plasma während der Coma-Behandlung (n=16)

Hinweis auf die thrombozytäre Adenylatzyklase-Aktivität gewertet werden [38, 102]. Die Zunahme der cAMP-Konzentration ist PGI_2 -dosisabhängig. Gorman et al. haben die Inkubationsdauer von 1 min. und eine PGI_2 -Dosis von $0.28 \mu\text{M}$ als Versuchsbedingungen herausgearbeitet, die einen annähernd maximalen cAMP-Anstieg im PRP erzielen lassen. Sie kamen deshalb in dieser Studie zur Anwendung.

5.2.2 Typ I-Diabetiker (Gruppe II)

Die basalen cAMP-Konzentrationen im PRP unterschieden sich nach Besserung der metabolischen Stoffwechselkontrolle nur geringfügig von den zu Beginn der Therapie gemessenen Werten. Der basale cAMP-Spiegel fiel von durchschnittlich $29 \pm 3 \text{ pmol/ml}$ auf $24 \pm 2 \text{ pmol/ml}$. Ebenso zeigten die cAMP-Konzentrationen nach Stimulation der Adenylatzyklase mit $0.28 \mu\text{M}$ Prostazyklin (PGI_2) keine signifikanten Unterschiede; bei schlechter metabolischer Kontrolle wurden durchschnittlich $214 \pm 35 \text{ pmol/ml}$, bei verbesserter Einstellung $178 \pm 18 \text{ pmol/ml}$ gemessen. Wurde zusätzlich die Phosphodiesterase mit 1mM IBMX blockiert, ergab sich zunächst eine mittlere cAMP-Konzentration von $619 \pm 79 \text{ pmol/ml}$, bei der 2. Untersuchung $533 \pm 42 \text{ pmol/ml}$; die Differenz dieser beiden Meßreihen liegt ebenfalls nicht im Signifikanzbereich. Die Aktivität der cAMP-synthetisierenden Adenylatzyklase blieb weitgehend unverändert: Nach PGI_2 -Stimulation stiegen die cAMP-Spiegel vor und nach der Therapie durchschnittlich um den Faktor 7.4 an. Bei zusätzlicher IBMX-Inkubation erhöhten sich die mittleren cAMP-Konzentrationen um das 21.3-fache und um den Faktor 22.2 nach zweiwöchiger Insulintherapie (Tab. 10).

Tabelle 10: cAMP-Messungen im PRP bei insulinpflichtigen Diabetikern (Gruppe II), Basale cAMP-Spiegel, sowie nach Inkubation mit PGI_2 bzw. PGI_2 und IBMX bei schlechter (1. Untersuchung) und verbesserter (2. Untersuchung) metabolischer Kontrolle sowie Vielfaches der basalen cAMP-Konzentrationen.

	<u>Gruppe II</u> (n = 24)	
	1. Untersuchung	2. Untersuchung
$[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	29 ± 3	24 ± 2
$[\text{cAMP}]_{\text{PGI}_2}$	214 ± 35	178 ± 18
Vielfaches v. $[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	7.4	7.4
$[\text{cAMP}]_{\text{PGI}_2, \text{IBMX}}$	619 ± 79	533 ± 42
Vielfaches v. $[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	21.3	22.2
Werte in pmol/ml ; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$		

Tabelle 11: cAMP-Messungen im PRP bei zunächst mit oralen Antidiabetica behandelten Diabetikern (Gruppe III).

Basale cAMP-Spiegel, sowie nach Inkubation mit PGI_2 bzw. PGI_2 und IBMX bei schlechter (1. Untersuchung) und verbesserter (2. Untersuchung) metabolischer Kontrolle sowie Vielfaches der basalen cAMP-Konzentrationen.

	Gruppe III (n = 23)	
	1. Untersuchung	2. Untersuchung
$[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	23 ± 3	25 ± 2
$[\text{cAMP}]_{\text{PGI}_2}$	184 ± 21	217 ± 22
Vielfaches v. $[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	8.0	8.7
$[\text{cAMP}]_{\text{PGI}_2'}$ IBMX	519 ± 66	537 ± 43
Vielfaches v. $[\text{cAMP}]_{\text{basal}}$	22.6	21.5
Werte in pmol/ml; $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$		

5.2.3 Typ II-Diabetiker (Gruppe III)

Die durchschnittlichen cAMP-Konzentrationen vor und nach Stimulation lagen trotz des unterschiedlichen Aggregationsverhaltens gegenüber Gruppe II in denselben Größenordnungen. Der Basalspiegel betrug durchschnittlich 23 ± 3 pmol/ml vor bzw. 25 ± 2 pmol/ml nach der Therapie. PGI_2 erhöhte zunächst auf 184 ± 21 pmol/ml, das entspricht dem 8-fachen des Basalspiegels, bei der 2. Untersuchung auf 217 ± 22 pmol/ml, das bedeutet eine Steigerung um den Faktor 8.7.

PGI_2 - und gleichzeitige IBMX-Inkubation ergaben 519 ± 66 pmol/ml (1. Untersuchung) gegenüber 537 ± 43 pmol/ml. Das entspricht einer Anhebung des cAMP-Basalspiegels um den Faktor 22.6 bzw 21.5 (Tabelle 11).

5.3 β -Thromboglobulin (β -TG)

Die bei den Gruppen II und III durchgeführten Bestimmungen der β -Thromboglobulinkonzentrationen im Plasma ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Untersuchung. Die mittlere β -TG-Konzentration betrug bei Gruppe II zunächst $69 \pm$ ng/ml und stieg nach zweiwöchiger Therapie auf 79 ± 10 ng/ml an; diese Differenz liegt jedoch nicht im Signifikanzbereich.

Bei den Diabetikern der Gruppe III lag der β -TG-Spiegel vor Therapiebeginn bei 84 ± 12 ng/ml; nach Normalisierung der Blutzuckerwerte betrug er 89 ± 11 ng/ml (Tab. 12). Verglichen mit den mit der gleichen Methodik erhaltenen Normalwerten ($40 - 50$ ng/ml [52]) fällt eine deutliche Erhöhung der gemessenen Konzentrationen gegenüber dem Normbereich auf.

Tabelle 12: B-Thromboglobulinplasmaspiegel bei schlechter und verbesserter Diabeteseinstellung
(Gruppen II und III) ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)

<u>B-Thromboglobulin</u> [ng/ml]	1. Untersuchung	2. Untersuchung
Gruppe II (n = 24)	69 ± 9	79 ± 10
Gruppe III (n = 23)	84 ± 12	89 ± 11

5.4 Blutfette (Triglyzeride, Cholesterin, HDL-Cholesterin)

Durch eine verbesserte metabolische Stoffwechselkontrolle konnte bei den Diabetikern der Gruppe II der Triglyzeridspiegel von durchschnittlich 159 ± 17 mg/dl auf 123 ± 11 mg/dl signifikant ($p < 0.05$), bei den Patienten der Gruppe III sogar hochsignifikant ($p < 0.01$) von 315 ± 52 mg/dl auf 170 ± 24 mg/dl gesenkt werden. Eine Korrelation mit der Thrombozytenaggregation konnte jedoch nicht gefunden werden.

Die Mittelwerte für Gesamtcholesterin blieben in beiden Gruppen weitgehend konstant: 271 ± 21 mg/dl gegenüber 274 ± 20 mg/dl (Gruppe III). Bei Gruppe II wurde sogar ein leichter Anstieg von durchschnittlich 217 ± 14 mg/dl auf 228 ± 12 mg/dl registriert; die Differenz liegt jedoch nicht im Signifikanzbereich.

Die HDL-Fraktion des Cholesterins blieb bei den Diabetikern der Gruppe II konstant: 50.7 ± 2.9 mg/dl betrug der Durchschnittswert der 1. Messung; bei 50.9 ± 2.8 mg/dl lag der mittlere HDL-Cholesterinwert nach Normalisierung der Blutzuckerspiegel. Bei den Patienten der Gruppe III erhöhte sich der mittlere HDL-Cholesterinspiegel von 43.6 ± 3.8 mg/dl auf 48.0 ± 4.8 mg/dl (Tab. 13, Tab 14).

5.5 Korrelationsberechnungen

5.5.1 HbA₁ und Blutzuckerwerte

Außer einer hochsignifikanten Reduktion der Blutzuckerwerte (vgl. Abschnitt 3 "Patientenkollektive") ergaben Messungen der HbA₁-Konzentrationen bei den Patientengruppen II und III hochsignifikante Unterschiede ($p < 0.01$).

Tabelle 13: Patientengruppe II: Triglyzeride, Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin bei schlechter und verbesserter Stoffwechseleinstellung ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$; n=24)

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Signifikanz
<u>Triglyzeride</u> (mg/dl)	159 $\pm$ 17	123 $\pm$ 11	p < 0.05*
<u>Gesamtcholesterin</u> (mg/dl)	217 $\pm$ 14	228 $\pm$ 12	—
<u>HDL-Cholesterin</u> (mg/dl)	50.7 $\pm$ 2.9	50.9 $\pm$ 2.8	—

(* Wilcoxon-Test)

Tabelle 14: Patientengruppe II: Triglyzeride, Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin bei schlechter und verbesserter Stoffwechseleinstellung ($\bar{x} \pm S.E.M.$; n=23)

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Signifikanz*
Triglyzeride [mg/dl]	315 $\pm$ 52	170 $\pm$ 24	p < 0.01
Gesamtcholesterin [mg/dl]	271 $\pm$ 21	274 $\pm$ 20	—
HDL-Cholesterin [mg/dl]	43.6 $\pm$ 3.8	48.0 $\pm$ 4.8	—

(* Wilcoxon-Test)

Bei der Patientengruppe II konnte nach Normalisierung der Blutzuckerwerte eine Reduktion des HbA_{1c} -Anteils von $14.5 \pm 0.5 \%$ auf $10.9 \pm 0.4 \%$ nachgewiesen werden. Bei den Diabetikern der Gruppe III ergab sich ebenso eine Verminderung von $14.1 \pm 0.5 \%$ auf $11.4 \pm 0.5 \%$. Zwischen Blutzuckerkonzentrationen und HbA_{1c} -Werten wurde eine signifikante Korrelation gefunden (Abb. 13).

5.5.2 Thrombozyten-Aggregation und Blutzuckerwerte bzw. HbA_{1c}

Bei der Patientengruppe II wurde eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Blutglucosekonzentration (bzw. des HbA_{1c} -Spiegels) und der zur Auslösung einer 50-prozentigen Aggregation notwendigen ADP-Konzentration nachgewiesen.

Es besteht also nicht nur ein Zusammenhang zwischen dem Aggregationsverhalten und dem mehr qualitativen Kriterium "gute bzw. schlechte Einstellung" (vgl. Abschnitt 1), sondern darüber hinaus eine signifikante bzw. hochsignifikante Korrelation zwischen Blutzucker- bzw. HbA_{1c} -Konzentration und dem Aggregationsverhalten der Thrombozyten (Abb. 14, 15).

5.5.3 Thrombozyten-Aggregation und Diabetesdauer

Die durchschnittliche Diabetesdauer bei den Patienten der Gruppe II (insulinpflichtige Diabetiker) betrug 7.7 Jahre (± 7.0). Eine Korrelation zwischen dem Aggregationsverhalten der Thrombozyten und der Dauer der Diabetes konnte aufgrund der starken Schwankungen der Thrombozytenaggregation je nach Diabeteseinstellung nicht gefunden werden.

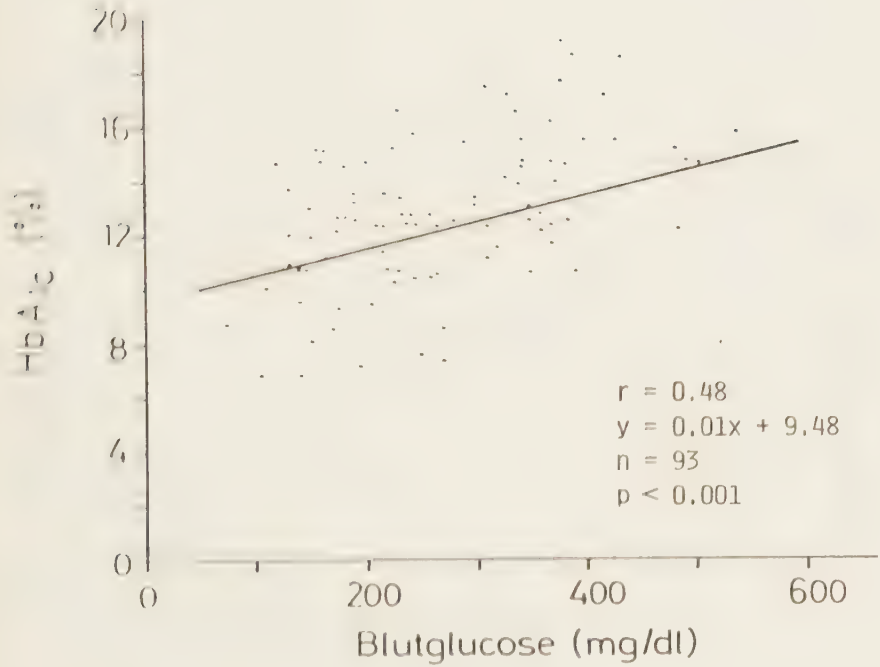


Abbildung 13. Blutglucosekonzentration und prozentueller HbA_{1c}-Anteil am Gesamthämoglobin bei Diabetikern

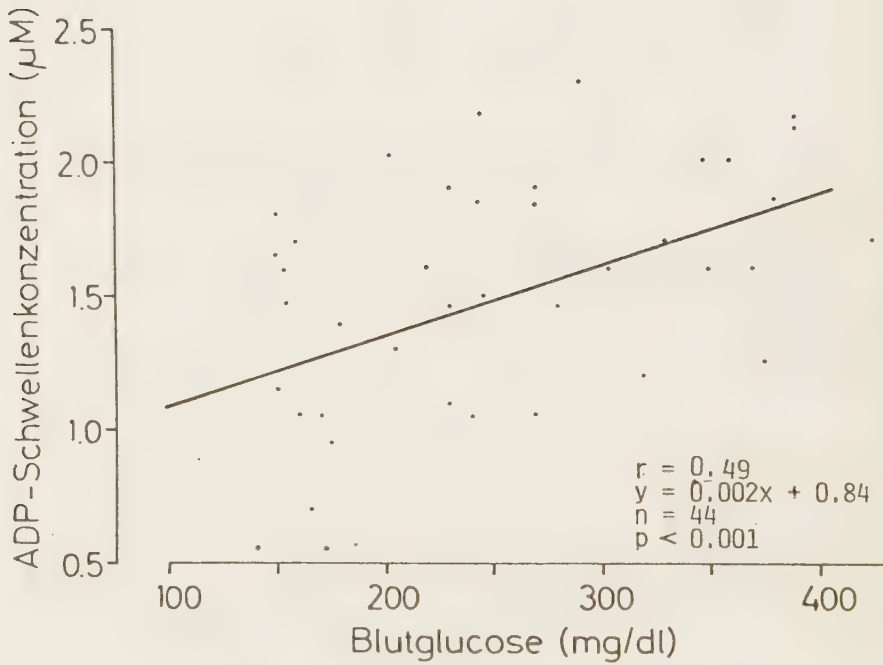


Abbildung 14: Blutglucosekonzentration und ADP-Schwelenkonzentration bei insulinpflichtigen Diabetikern

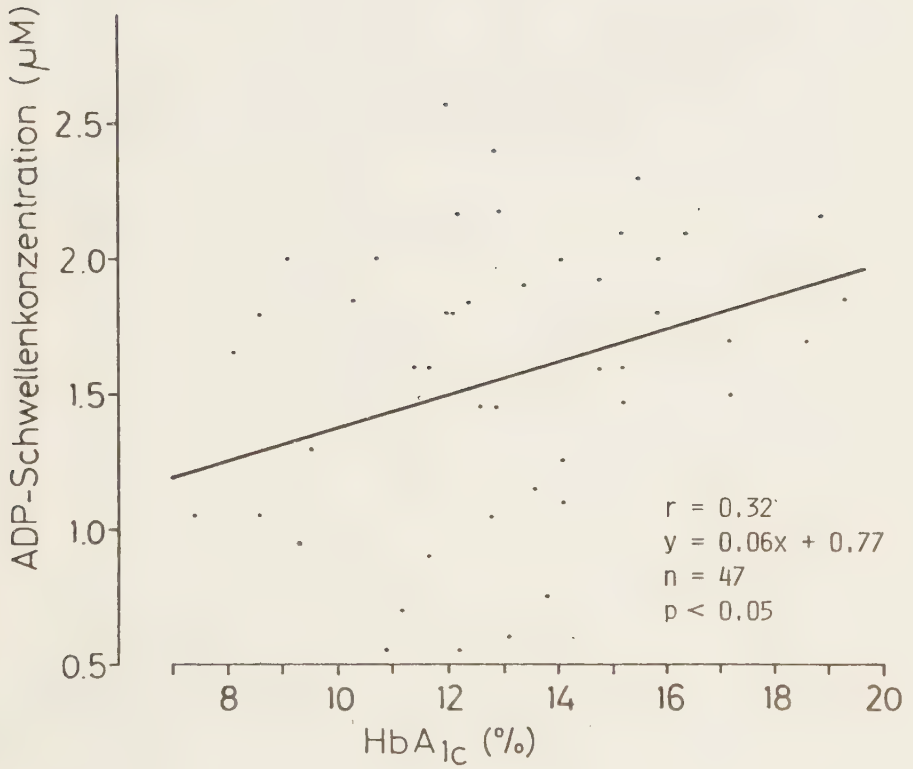


Abbildung 15: Prozentueller HbA_{1c}-Anteil am Gesamthämoglobin und ADP-Schwellenkonzentration bei insulinpflichtigen Diabetikern

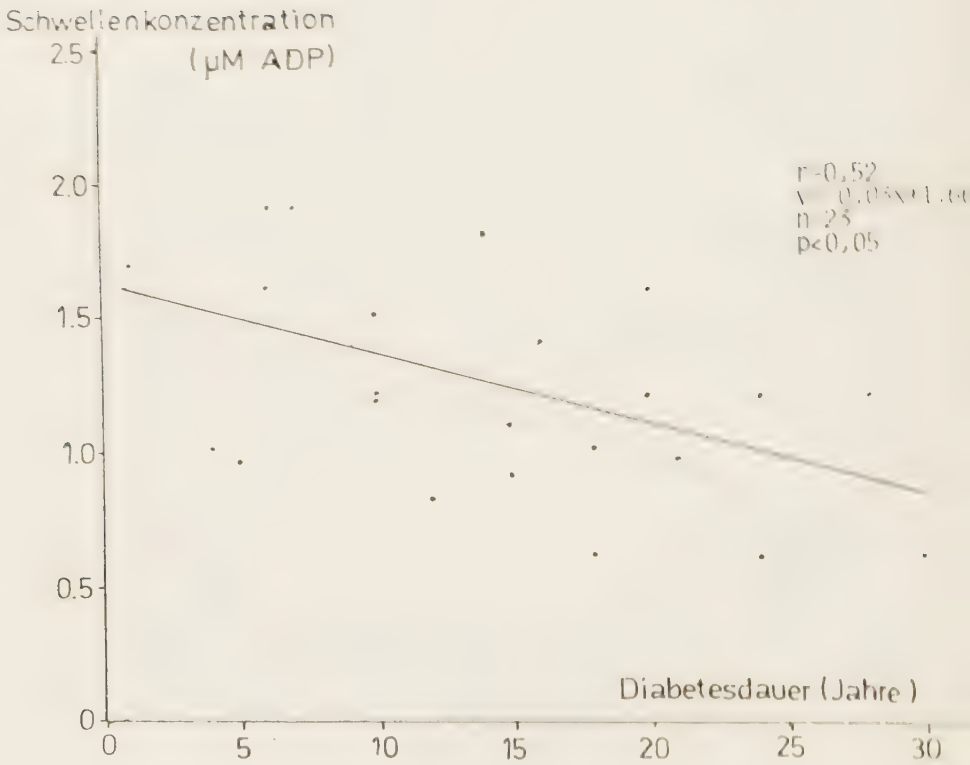


Abbildung 16: Diabetesdauer und ADP-Schwellenkonzentration bei Patienten mit Typ II-Diabetes

Im Gegensatz dazu konnte bei der Diabetikergroup III rechnerisch ein Zusammenhang zwischen Diabetesdauer und Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden: Die durchschnittliche Diabetesdauer lag bei 12.6 ($\pm$ 7.6) Jahren; es bestand eine signifikante Korrelation ($p < 0.05$) zwischen der Dauer der Erkrankung und dem Aggregationsverhalten der Plättchen gemessen an der ADP-Schwellenkonzentration (vgl. Abb. 16).

6. Diskussion

6.1 Bisherige Untersuchungen der Thrombozytenaggregation bei Diabetikern

Es gilt heute als gesichert, daß Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Angiopathien spielen. Eine große Zahl von Forschungsgruppen beschäftigte sich deshalb mit der Frage der Thrombozytenfunktion bei Diabetikern, da diese Patienten besonders zu mikro- und makroangiopathischen Komplikationen neigen [48, 49, 51]. Dabei wurde häufig eine gesteigerte Thrombozytenreaktivität bei Diabetikern gegenüber nichtdiabetischen Kontrollpersonen beschrieben. In der Literatur finden sich Berichte über:

- erhöhte Thrombozytenaggregabilität [33, 44, 45, 74]
- erhöhte Sensibilität gegenüber aggregierenden Substanzen [1, 8, 26, 50, 75]
- erhöhte Plasma- β -Thromboglobulinspiegel [15, 16, 81, 91, 92].

Diese Resultate blieben jedoch nicht unwidersprochen; so wurde die Thrombozytenaggregation sowohl als normal [27, 41, 77] als auch als verändert beschrieben [23, 63, 87]. Für diese divergenten Ergebnisse dürften zwei Hauptgründe verantwortlich sein:

1. Eine Ursache dürfte in dem bekannt hohen Variationskoeffizienten von Thrombozytenfunktionstests [2] liegen (vgl. 6.2.1).
2. Die Diabetiker wurden meist ohne Berücksichtigung ihrer Stoffwechseleinstellung in Kollektive zusammengefaßt; der Einfluß der DiabetesEinstellung auf die Thrombozytenfunktionen blieb meist unberücksichtigt.

6.2 Thrombozytenaggregation

6.2.1 Problematik der Messung und Auswertung der Thrombozytenaggregation

Daten über das Ausmaß der Thrombozytenaggregation sind in der Literatur schwer vergleichbar, da der Aggregationsvorgang nach unterschiedlichen Zeiten gemessen oder aber die Aggregationswelle verschieden quantifiziert wurde. Zum Teil wurde nur die Angabe "beschleunigte" oder "nicht beschleunigte" Thrombozytenaggregation gemacht [75]. Wiederum andere Autoren werteten nur das Auftreten einer zweiten Thrombozytenaggregations-Welle [39], ohne Angaben über das Ausmaß zu machen. Darüberhinaus wurden recht unterschiedliche Konzentrationen der Thrombozytenaggregations-Induktoren gewählt (z.B. $0,25 \mu\text{M}$ [107] bis $10 \mu\text{M}$ ADP [79]). In den letzten Jahren hat das von Burrows vorgeschlagene Verfahren der Bildung einer "dose-response" - Kurve mit steigenden Konzentrationen des Aggregationsinduktors und Ermittlung des 50-prozentigen Wertes der maximalen Thrombozytenaggregation vielerorts Zustimmung erfahren [16]. Dieser Wert hat einmal den großen Vorteil, daß er sich aus vier Werten zusammensetzt und somit größere Aussagekraft als die Einzelbestimmung besitzt. Zum anderen ist er gut graphisch darstellbar oder läßt sich mit Hilfe einer Lineweaver-Burk-Geraden errechnen (vgl. 3.1.3). Von einigen Autoren wurde der Begriff "Schwellenkonzentration" (threshold concentration) [77] angewendet, der auch in der vorliegenden Arbeit für die ADP-Daten übernommen wurde.

6.2.2 Comastudie

Über die Aktivität der Thrombozyten im ketoazidotischen Coma liegen derzeit keine Untersuchungen vor. McLaren und Mitarbeiter [67] beschrieben eine verkürzte Gerinnungszeit und erhöhte Fibrinogenspiegel, jedoch eine verlängerte Prothrombinzeit. Da mehrere Studien über thromboembolische Komplikationen im diabetischen Coma vorliegen [61, 72, 80, 103], würde man eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten erwarten. Während einer Ketoazidose zeigte sich bei den durchgeführten Aggregationstests durchwegs eine verringerte Aggregationsneigung der Thrombozyten. Die gestörte Thrombozytenfunktion könnte erklären, warum thromboembolische Komplikationen insgesamt während der Ketoazidose selten auftreten, obwohl die Zirkulation häufig durch die Exsikkose behindert ist. Da die beobachteten thromboembolischen Komplikationen hauptsächlich im hyperosmolaren, nichtketoazidotischen Coma, nach einem Kreislaufschock und oft erst im Verlauf der Therapie nach weitgehender Normalisierung der erhöhten Blutglucosewerte auftraten [61, 80], dürfte die Ketoazidose per se nicht thrombogen sein. Diese in der Ketoazidose beobachtete Hemmung der Thrombozyten-Funktion dürfte vielmehr eine Art Thrombose-Schutzfaktor für den Organismus darstellen.

6.2.3 Typ I-Diabetiker ohne Ketoazidose

Bei den 24 insulinpflichtigen Diabetikern wurden zwar weniger starke Schwankungen der Thrombozyten-Reaktivität in Abhängigkeit von der Diabeteseinstellung gefunden, die Ergebnisse waren jedoch denen der Coma-Studie ähnlich. Es gibt in der Literatur nur sehr wenige Untersuchungen, die bei in-vitro-Aggregationen die Stoffwechseleinstellung des Diabetikers berücksichtig-

ten. Peterson und Mitarbeiter [78] beobachteten bei sieben Diabetikern nach Normalisierung der Blutglucosekonzentration einen verzögerten Eintritt der sekundären Thrombozytenaggregation; zur Induktion wurden jedoch ungewöhnlich hohe Adrenalin-Konzentrationen (70 μ M) benutzt. Hilsted et al. [46] beschrieben eine verstärkte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in der Hypoglykämie bei fünf von sechs untersuchten Diabetikern. Walter et al. [108] beobachteten bei Nüchternblutzuckerwerten über 160 mg/dl einen erniedrigten Thrombozytenaggregationswert; die Differenz gegenüber den Aggregationsdaten bei guter Einstellung lag jedoch nicht im Signifikanzbereich. Es erscheint auf den ersten Blick erstaunlich, bei Hyperglykämie eine verminderte Aggregationsneigung der Thrombozyten vorzufinden, da doch eine schlechte Stoffwechseleinstellung als Schrittmacher für Gefäßkomplikationen gilt und besonders aktivierte Thrombozyten zu erwarten wären.

Andererseits wäre es verwunderlich, wenn die metabolische Situation der Thrombozyten bei einer Stoffwechselentgleisung besonders günstig wäre, während die anderen korpuskulären Bestandteile des Blutes subnormale Funktionen aufweisen: Erythrozyten zeigen bei anhaltender Hyperglykämie, vermutlich aufgrund einer vermehrten Glykosylierung des Hämoglobins (HbA_1), eine veränderte Sauerstoffaffinität sowie gestörte rheologische Eigenschaften [56]. Die polymorphkernigen Leukozyten scheinen in fast allen Funktionen beeinträchtigt: Es zeigt sich eine gestörte Adhäsivität, Transmigration, Chemotaxis und Phagozytoseaktivität dieser Zellen [3, 66, 101]. Bei Lymphozyten wurden ebenfalls Funktionseinschränkungen in der Hyperglykämie nachgewiesen [19, 82]. Diese Störungen korrelieren größtenteils deutlich mit dem Ausmaß hyperglykämischer Zustände und sind bei verbesserter metabolischer Kontrolle weitgehend reversibel [56, 78].

Dieser enge Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und der

Reaktivität der korpuskulären Elemente des Blutes konnte für die Thrombozyten in den Korrelationsberechnungen zwischen Thrombozytenaggregation und Blutzuckerwerten bzw. HbA_{1c} -Spiegeln eindeutig bestätigt werden.

Die beeinträchtigte Thrombozytenaggregation in vitro läßt natürlich nur bedingt auf ein ebensolches Verhalten der Plättchen in vivo schließen. Theoretisch könnte der Effekt einer verminderten Thrombozytenaggregabilität durch eine herabgesetzte Prostacyclinproduktion der Gefäßintima bei Hyperglykämie aufgehoben werden [53, 98]. Die Ursache für die nach Normalisierung der Blutglucosewerte beobachtete verstärkte Aggregabilität der Thrombozyten ist ungeklärt. Sie könnte durch eine vermehrte Anzahl jüngerer Thrombozyten bedingt sein, von denen bekannt ist, daß sie erhöhte Enzymaktivitäten und hyperaktive Funktionen aufweisen [57, 58, 59]. Möglicherweise werden diese jungen Plättchen in den ersten Tagen nach der Stoffwechselentgleisung in besonders großer Zahl produziert [26, 36]. In den letzten Jahren mehrten sich die Argumente für die Annahme, daß eine gute Stoffwechseleinstellung auf lange Sicht mit einer Verminderung an Gefäßkomplikationen einhergeht. Doch zeigen die eigenen Untersuchungen, daß mit Normalisierung des Blutzuckers auch eine Demaskierung einer Hyperaggregabilität der Thrombozyten - zumindest für eine gewisse Zeit - erfolgen kann.

6.2.4 Typ II-Diabetiker

Die Bewertung der Thrombozytenaggregations-Daten von zunächst mit oralen Antidiabetika behandelten Patienten erscheint problematisch, da fast alle Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Digitalis- und/oder antihypertensiver Therapie standen. Ein möglicher Ef-

fekt dieser Medikamente auf die Thrombozytenreaktivität kann nicht mit Gewißheit ausgeschlossen werden.

Das Ausmaß der Thrombozytenaggregation bleibt bei schlechter und bei verbesserter Diabeteseinstellung im Mittel weitgehend unverändert. Eine deutliche Zunahme der Aggregationsneigung der Plättchen konnte nur bei sieben Patienten dieser Gruppe, die eine manifeste diabetische Retinopathie aufwiesen, gefunden werden. Hier lag ein ähnliches Aggregationsverhalten der Thrombozyten wie bei Typ I-Diabetikern vor, doch ist eine Interpretation auch aufgrund der geringen Patientenzahl nur mit Einschränkungen möglich. Eine signifikante Korrelation der Thrombozyten-Aggregabilität mit dem Blutglucose- bzw. HbA_{1c} -Spiegel ist bei dieser durchschnittlich wesentlich älteren Patientengruppe jedenfalls nicht vorhanden.

Beim Vergleich mit Aggregationsergebnissen von gesunden, nichtdiabetischen Kontrollpersonen [50] fällt die deutlich erhöhte Aggregationsneigung der Plättchen von Diabetikern auf, die bei manifester Retinopathie noch verstärkt ist. Diese Befunde stützen die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse einer erhöhten Thrombozyten-Aggregabilität bei Diabetikern, besonders bei bestehender Mikroangiopathie [52]. Der modifizierende Einfluß der Diabeteseinstellung scheint bei dieser Patientengruppe von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Interessant ist die Beziehung zur Diabetesdauer: Die signifikante Korrelation von Thrombozytenaggregation und Diabetesdauer, die bei diesem Patientenkollektiv gefunden wurde, könnte auf das Vorliegen einer Mikroangiopathie als modifizierenden Faktor hinweisen, da mit fortschreitender Diabetesdauer auch mit einer Zunahme von Veränderungen an den kleinsten Gefäßen gerechnet werden muß.

6.3 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) im plättchenreichen Plasma

Auf der Suche nach den biochemischen Grundlagen für das Aggregationsverhalten der Thrombozyten wurde erstmals von Salzman und Neri eine Beziehung zwischen dem intrathrombozytären cAMP-Spiegel und der Aggregationsneigung der Plättchen beobachtet [90]. Bei reduzierter Aggregationsbereitschaft fanden sie erhöhte cAMP-Konzentrationen, während bei einer verstärkten Thrombozytenaggregation niedrige cAMP-Spiegel vorlagen [88]. Das Ausmaß der intrathrombozytären cAMP-Synthese wird durch die membranständige Adenylatzyklase gesteuert, deren Aktivität in vivo im wesentlichen durch die Prostaglandine Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxan A_2 (TXA_2) [30, 102] beeinflusst wird. Moncada stellte die Theorie auf, daß das Gleichgewicht von in der Gefäßwand synthetisiertem PGI_2 und in den Thrombozyten gebildetem TXA_2 die Thrombozytenaggregation entscheidend steuert [68]. Es liegen mehrere Berichte über Störungen der PGI_2 -Synthese [53, 92, 97] sowie eine veränderte Aktivität der Adenylatzyklase [52], dem Effektorenzym des PGI_2 , bei Diabetikern, vor allem bei Patienten mit Mikroangiopathie, vor. Ein Einfluß der Diabeteseinstellung auf dieses System, insbesondere auf die Aktivität der Adenylatzyklase, wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Da die PGI_2 -vermittelte Anhebung des cAMP-Spiegels als Hinweis auf die Adenylatzyklase-Aktivität gewertet werden kann [38, 102], deutet der geringe cAMP-Anstieg während der Ketoazidose auf eine Beeinträchtigung der Aktivität dieses Enzyms hin. Mit Besserung der Stoffwechseleinstellung dürfte die Adenylatzyklase-Aktivität zunehmen, da der PGI_2 -induzierte Anstieg des cAMP im PRP deutlich höher ausfiel; nach 5-tägiger Insulintherapie wurden die höchsten Werte gemessen. Die Ursache

für die hohen cAMP-Konzentrationen im PRP während der Ketoazidose und die signifikante Abnahme nach Senkung der Blutzuckerwerte ist ungeklärt. Da die cAMP-Messungen im PRP erfolgten, dürfte der überwiegende Anteil des cAMP-Spiegels plasmatischer Herkunft sein. Beim Rückgang der cAMP-Konzentrationen im PRP während der Therapie der Ketoazidose kann aber wohl nicht auf eine Abnahme des intrathrombozytären cAMP-Spiegels geschlossen werden. Da die Adenylatzyklase-Aktivität während der Ketoazidose offenbar vermindert ist, dürfte nicht-thrombozytäres cAMP für die hohen Konzentrationen in der Stoffwechselentgleisung verantwortlich sein. Überraschend waren die Befunde der Thrombozytenaggregation -Tests, die eine deutlich eingeschränkte Thrombozytenfunktion in der Ketoazidose und eine "Hyperaggregabilität" bei Besserung der Stoffwechsellage ergaben. Offensichtlich sind bei guter Stoffwechseleinstellung nicht nur die antiaggregatorischen [12], sondern auch die aggregatorisch wirksamen Enzyme in ihrer Aktivität gesteigert.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Karpatkin erhöhte Enzymaktivitäten in jüngeren Thrombozyten nachweisen konnte [57, 58, 59], die bei Diabetikern wiederholt in erhöhter Anzahl gefunden wurden [26, 36]. Es wäre vorstellbar, daß nach Besserung der Stoffwechsellage vermehrt Thrombozyten in die Zirkulation abgegeben werden.

Diese im Laufe der Ketoazidosetherapie beobachteten Veränderungen der Adenylatzyklase-Aktivität konnten bei nicht-ketoazidotischen Diabetikern nach Verbesserung der Stoffwechselkontrolle nicht nachgewiesen werden. Trotz deutlicher Zunahme der Thrombozyten-Aggregabilität bei Patienten mit Typ I-Diabetes blieben die cAMP-Anstiege nach PGI_2 -Stimulation weitgehend unverändert.

Da es sich jedoch dabei um weniger gravierende Stoffwechselentgleisungen handelte, war eine vergleichbar starke Beeinträchtigung der Adenylatzyklase-Aktivität nicht zu erwarten. Die geringere Schwankungsbreite der Thrombozytenfunktionen kommt in der zwar deutlich signifikanten, aber wesentlich geringeren Zunahme der Thrombozytenaggregation (im Mittel um 40-50%) zum Ausdruck; nach Therapie der Ketoazidose betrug die Zunahme durchschnittlich 400 %.

Da die Bestimmung des cAMP im PRP erfolgte, ist nicht auszuschließen, daß geringere Unterschiede der stimulierten cAMP-Spiegel in den Thrombozyten durch den hohen Plasmagehalt an cAMP verborgen blieben.

5.4 B-Thromboglobulin

Es scheint in der Literatur Übereinstimmung darüber zu bestehen, daß die B-TG-Spiegel bei Diabetikern erhöht sind [16, 52, 81, 91, 110]. In manchen Studien fiel bei gleichzeitig bestehender Mikroangiopathie eine besonders deutliche Zunahme auf [81]. Eine Normalisierung erhöhter B-TG-Werte wurde bei 7 frisch entdeckten Diabetikern nach adäquater Therapie von Preston et al. beobachtet [81]. Schernthaner und Mitarbeiter beschrieben eine Korrelation zwischen der B-TG-Konzentration und dem glykosylierten Hämoglobin HbA₁ [91], die allerdings von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte [111]. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen B-TG-Konzentration und der Diabeteseinstellung konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen werden: Die bei schlechter Einstellung ermittelten B-TG-Spiegel änderten sich gegenüber späteren Kontrollen bei verbesserten Blutglucosewerten kaum.

Die Größenordnung der β -TG-Werte (70-80 ng/ml) stimmt jedoch mit den von anderen Autoren bei Diabetikern ermittelten Konzentrationen überein [81]. Die bereits mehrfach getroffene Feststellung einer erhöhten β -TG-Plasmakonzentration bei Diabetikern wird dadurch bestätigt. Die hohen β -TG-Spiegel könnten darauf hinweisen, daß bei Diabetikern ein gesteigerter Thrombozyten-Verbrauch stattfindet [64]. Die bei Patienten mit Typ II-Diabetes ständig erhöhten β -TG-Werte deuten möglicherweise auf eine vermehrte Bildung von Plättchenaggregaten, die ja in vitro - unabhängig von der Diabeteseinstellung - nachgewiesen werden konnte (vgl. 6.2.4). Möglicherweise kommt bei diesem Patientenkollektiv mit höherem Durchschnittsalter eine Altersabhängigkeit der β -TG-Werte zum Ausdruck; manche Autoren geben für gefäßgesunde Patienten höheren Lebensalters einen Normalwert von 93 ng/ml an [112], ohne daß dafür eine Erklärung gefunden werden konnte [65].

Es finden sich jedoch bei den meisten Patienten extreme Schwankungen der β -TG-Messungen, deren Ursache bislang unklar ist. Sicherlich ist die Blutentnahmetechnik eine der Hauptfehlerquellen. So ist es auch nicht verwunderlich, daß noch keine eindeutige Korrelation von Thrombozytenaggregation in vitro und Plasma- β -TG-Werten als Ausdruck der Thrombozytenaggregation in vivo gefunden wurde. Aufgrund der Fehleranfälligkeit und des überaus hohen Variationskoeffizienten der β -TG-Bestimmungen sollte eine Interpretation der Daten nur mit entsprechender Vorsicht erfolgen.

6.5 Blutfette

Ein Einfluß der Blutfette, insbesondere der bei Diabetikern häufig erhöhten Triglyzeride, auf die Thrombozytenfunktion konnte nicht nachgewiesen werden. Diesbezügliche Publikationen [10, 18, 21, 54, 94, 100, 105, 111] haben deshalb auch keine allgemeine Bestätigung erfahren. Shattil berichtet über eine veränderte Membranstruktur der Thrombozyten mit einer vermehrten Einlagerung von Cholesterin bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie und beschreibt eine signifikante Korrelation zwischen dem Cholesteringehalt der Thrombozyten-Membran und der Sensitivität der Thrombozyten gegenüber einer Aggregationsinduktion mit Adrenalin [95]. Die eigenen Untersuchungen widerlegen zwar nicht die Ergebnisse, die an den Thrombozytenmembranen von Patienten mit Fettstoffwechselstörungen gefunden wurden, der modulierende Effekt der Serumlipide auf die Thrombozytenreaktivität wurde jedoch nicht bestätigt.

6.6 Abschließende Betrachtung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß bei Typ I-Diabetikern die Diabeteseinstellung einen erheblichen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation in vitro ausübt. Es wurde gezeigt, daß in der diabetischen Ketoazidose die Thrombozytenfunktion im Vergleich zu späteren Kontrollen eingeschränkt, d.h. die Thrombozytenaggregation vermindert ist. Der gleichzeitig reduzierte PGI_2 -vermittelte cAMP-Anstieg im PRP (als Hinweis auf die Adenylatzyklase-Aktivität) kann ebenfalls als Ausdruck eines gestörten Thrombozytenstoffwechsels gewertet werden. Diese in der Ketoazidose beobachtete Hemmung der Thrombozytenfunktion könnte erklären, warum thromboembolische Zwischenfälle insgesamt eine seltene

Komplikation im diabetischen Coma darstellen.

Nach Besserung der Diabeteseinstellung zeigt sich bei Typ I-Diabetikern eine "Hyperaggregabilität" der Thrombozyten sowie ein deutlich gesteigerter cAMP-Anstieg bei PGI_2 -Stimulation.

Für die Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von der Diabeteseinstellung kommen mehrere Ursachen in Frage: Die ungünstige metabolische Situation bei einer Stoffwechselentgleisung könnte die beeinträchtigte Thrombozytenaktivität, die ja als energieabhängiger Prozeß [20, 42] zu sehen ist, erklären. Die bei verbesserter Diabeteseinstellung beobachtete Hyperaggregabilität ist möglicherweise durch eine erhöhte Anzahl jüngerer Thrombozyten bedingt [26, 36], von denen bekannt ist, daß sie erhöhte Enzymaktivitäten aufweisen [57, 58, 59].

Berichte über erhöhte B-TG-Spiegel bei Diabetikern [16, 17, 52, 81], die möglicherweise auf eine erhöhte Freisetzung dieses Proteins in vivo und einen gesteigerten Thrombozytenumsatz hinweisen [64], konnten bestätigt werden. Ein Einfluß der Diabeteseinstellung auf die Höhe der B-TG-Konzentration konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß B-TG-Messungen eine große Fehleranfälligkeit und einen hohen Variationskoeffizienten aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnte nur Hinweise auf einen gestörten PGI_2 -TXA₂-cAMP-Stoffwechsel beim Diabetiker geben. Aufgabe von künftigen Studien muß es sein, diese Ergebnisse durch exakte intrathrombozytäre Messungen zu ergänzen.

Es ist heute noch ungeklärt, ob diese Befunde eine klinische Relevanz besitzen und ob die beschleunigte Thrombozytenaggregation in vitro einen eigenständigen vaskulären Risikofaktor darstellt [26, 62]. Der beobachtete Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die

Thrombozytenfunktion beim Diabetiker verlangt allerdings, daß in künftigen Thrombozyten-Studien dieser metabolische Faktor mitberücksichtigt wird, was generell in der Vergangenheit nicht geschehen ist.

7. Zusammenfassung

Bei der Pathogenese der Mikro- und Makroangiopathie des Diabetikers wird den Thrombozyten eine bedeutende Rolle zuerkannt. Gleichzeitig mehren sich in den letzten Jahren die Argumente für die Annahme, daß eine gute Stoffwechseleinstellung auf lange Sicht mit einer Verminderung an Gefäßkomplikationen einhergeht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluß der Diabeteseinstellung auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen. Im intraindividuellen Vergleich wurden Thrombozytenaggregation, B-TG-Plasmaspiegel, cAMP-Konzentrationen im PRP und die Stimulierbarkeit der cAMP-Synthese durch PGI_2 gemessen, jeweils zu Beginn und nach 5- bzw. 14-tägiger stationären Therapie. Weiterhin wurde der Einfluß der Serumlipide (Triglyzeride, Cholesterin, HDL-Cholesterin) auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Zur Beurteilung der Diabeteseinstellung dienten Blutzucker-Tagesprofile sowie HbA_{1c} -Messungen. Insgesamt wurden 63 Diabetiker während ihres stationären Aufenthaltes untersucht. In der Ketoazidose ($n=16$; Blutzuckerwert: 745 ± 149 mg/dl; Bicarbonat: 3.9 ± 1.0 mmol/l) war die Thrombozyten-Aggregabilität im Vergleich zu späteren Kontrollen deutlich herabgesetzt: Die ADP-Schwellenkonzentration betrug zunächst 4.1 ± 1.6 μM und sank nach 5 Tagen und Besserung der Stoffwechsellage (Blutzuckerwert: 217 ± 22 mg/dl; Bicarbonat: 20.9 ± 0.9 mmol/l) auf 0.9 ± 0.1 μM ($p < 0.01$). Bei den Patienten mit Typ I-Diabetes ($n=24$) lag die Schwellenkonzentration bei schlechter, jedoch nicht ketoazidotischer Einstellung (Blutzuckerwert: 345 ± 13 mg/dl; HbA_{1c} : 14.5 ± 0.5 %) durchschnittlich bei 1.9 ± 0.2 μM ; nach 14-tägiger Therapie (Blutzuckerwert: 171 ± 9 mg/dl; HbA_{1c} : 10.9 ± 0.4 %) sank die Schwellenkonzentration auf 1.4 ± 0.2 μM ($p < 0.05$). Dabei konnte eine signifikante Korrelation der ADP-Schwellenkonzentrationen und der Blutzucker- bzw. HbA_{1c} -Werte nachgewiesen werden.

Bei den Patienten mit Typ II-Diabetes (n=23) ergab sich keine signifikante Änderung der Thrombozytenaggregabilität. Dieses Verhalten wurde unter anderem durch die Einnahme zahlreicher Medikamente, die bei diesen Patienten für den Zeitraum der Studie nicht abgesetzt werden konnten, erklärt.

Ein Zusammenhang zwischen der in-vitro-Reaktivität der Thrombozyten und gleichzeitig durchgeführten B-TG-Messungen konnte nicht gefunden werden.

Bezüglich der Blutfette findet man mit Verbesserung der Diabeteseinstellung zwar eine Senkung der Triglyzeride, eine signifikante Korrelation der Serumlipide mit der Thrombozytenreaktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Um zur Klärung der biochemischen Grundlagen der veränderten Thrombozytenreaktivität beizutragen, wurden Bestimmungen der cAMP-Konzentrationen im PRP durchgeführt und ihr Anstieg nach Inkubation mit PGI_2 gemessen. Der PGI_2 -vermittelte Anstieg kann als Ausdruck der Adenylatzyklase-Aktivität gewertet werden. In der Ketoazidose konnte die basale cAMP-Konzentration durch PGI_2 durchschnittlich nur um das 3.2-fache (von 78 ± 9 auf 249 ± 42 pmol/ml) gesteigert werden, nach Besserung der Stoffwechsellaage jedoch auf das 10.2-fache (von 29 ± 4 auf 296 ± 24 pmol/ml; $p < 0.05$); es zeigte sich somit eine erhebliche Hemmung des PGI_2 -vermittelten cAMP-Anstiegs bei schwerer Stoffwechselentgleisung des Diabetikers.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Thrombozyten-Funktion (Aggregation und antiaggregatorische Mechanismen) bei schweren Stoffwechselentgleisungen des Diabetikers gehemmt und nach Besserung der Einstellung deutlich gesteigert ist; es konnte somit ein erheblicher Einfluß der Diabeteseinstellung auf die Thrombozytenreaktivität nachgewiesen werden.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Avenarius, H.J.: Das Aggregationsverhalten der Thrombozyten bei verschiedenen Krankheiten der inneren Organe. In: v.Voss, H., U. Göbel (Hrsg.): Praktische Anwendung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. S. 173, Georg Thieme, Stuttgart, New York 1980

- 2 Avenarius, H.J., Deinhardt, J.: Durchführung und Auswertung von Aggregationstests. In: v.Voss, H., Göbel, U.: Praktische Anwendung der Thrombozytenfunktionsdiagnose. S. 57, Georg Thieme, Stuttgart 1980

- 3 Bagdade, J.D., Stewart, M., Walters, E.: Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. Diabetes 27 (1978) 677

- 4 Ballantyne, A.J., Löwenstein, A.: Disease of the retina. Trans. ophthal. Soc. U.K. 63 (1943) 95

- 5 Baumgartner, H.R.: Arteriosklerose und Thrombose, neue pathogenetische Gesichtspunkte. Internist 19 (1978) 627

- 6 Baumgartner, H.R., Tschopp, T.B.: Platelet interaction with aortic subendothelium in vitro: Locally produced PGI₂ inhibits adhesions and formation of mural thrombi in flowing blood. Tromb. Hamostas. 42 (1979) 6

- 7 Begg, G.S., Pepper, D.S., Chesterman, C.N., Morgan, F.J.: Complete covalent structure of human β -thromboglobulin. Biochem. 17 (1978) 1739

- 8 Bensoussan, D., Levy-Toledano, S., Passa, P., Caen, J., Cavinet, J.: Platelet hyperaggregation and increased plasma level of von Willebrand factor in diabetics with retinopathy. *Diabetologia* 11 (1975) 307
- 9 Bern, M., M.D.: Platelet functions in Diabetes mellitus. *Diabetes* 27 (1978) 342
- 10 Betteridge, D.J., Zahavi, J., Jones, N.A.G., Shine, B., Kakkar, V.V., Galton, D.J.: Platelet function in diabetes mellitus in relationships to complications, glycosylated hemoglobin and serum lipoproteins. *Europ. J. of Clin. Invest* 11 (1981) 273
- 11 Born, G.V.R.: Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 162 (1962)
- 12 Borseý, D.Q., Dawes, J., Fraser, D.M., Prowse, C. V., Elton, R.A., Clarke, B.F.: Plasma beta-thromboglobulin in diabetes mellitus. *Diabetologia* 18 (1980) 353
- 13 Breddin, K., Grun, H., Krzywanek, H.J., Schremmer, W.P.: Zur Messung der "spontanen" Thrombozytenaggregation. Plättchenaggregation III. Methodik. *Klin. Wschr.* 53 (1975) 81
- 14 Breddin, K., Krzywanek, H.J., Bald, U., Kutschera, J.: Is enhanced platelet aggregation a risk factor for thromboembolic complications in atherosclerosis? In: G. Schettler, A. Weizel: "Atherosclerosis III". Springer, Heidelberg, New York (1974) 197
- 15 Breddin, K.: Über die gesteigerte Thrombozytenagglugation bei Gefäßkrankheiten. *Schweiz. Med. Wschr.* 95 (1965) 655

- 16 Burrows, A.W., Chavin, S.I., Hockaday, T.D.R.: Plasma-thromboglobulin concentrations in diabetes mellitus. *Lancet* 1 (1978) 235
- 17 Campbell, I.W., Dawes, J., Fraser, D.M., Pepper, D.S., Clarke, B.F., Duncan, L.J.P., Cash, J.D.: Plasma β -thromboglobulin in diabetes mellitus. *Diabetes* 26 (1977) 1175
- 18 Carvalho, A.C.A., Colman, R.W., Lees, R.S.: Platelet function in hyperbetalipoproteinemia. *New Engl. J. Med.* 290 (1974) 434
- 19 Casey, J.I., Heeter, B.J., Klyshevich, K.A.: Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.* 136 (1977) 495
- 20 Cherniak, H.B.: Process of formation and utilisation of energy in human platelets. *Clin. Chimica Acta* (1964)
- 21 Colman, R.W.: Platelet function in hyperbetalipoproteinemia. *Thromb. Hemostas.* 39 (1978) 284
- 22 Colton, T.: *Statistics in Medicine*, Boston, Little, Brown, & Company (1974) 112
- 23 Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K., Levine, J., Sagel, J., Nair, R.M.G.: Altered platelet function in diabetes mellitus. *Diabetes* 25 (Suppl. 2) (1976) 826
- 24 Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K.E., Lopes-Virella, M.F., Sagel, J.: Vascular disease in diabetes. *Arch. Intern. Med.* 139 (1979) 225

- 25 Colwell, J., Halushka, P.V., Sarji, K.E., Sagel, J.: Platelet function and diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 62 (1978) 753
- 26 Colwell, J.A., Lopes-Virella, M., Halushka, P.V.: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 4 (1981) 121
- 27 Davis, J.W., Phillips, P.E., Yue, K.T.: Platelet aggregation. Adult-onset diabetes mellitus and coronary artery disease. *JAMA* 239 (1978) 732
- 28 Davis, T.E.M., Bown, E., Finch, D.R., Mitchell, M.D., Turner, R.C.: In-vitro venous prostacyclin production, plasma 6-ketoprostaglandin $F_{1\alpha}$ concentrations, and diabetes retinopathy. *Brit. med. J.* 282 (1981) 1259
- 29 Davis, T.M.E., Mitchell, M.D., Turner, R.C.: Prostacyclin and thromboxane metabolites in diabetes. *Lancet* II (1979) 789
- 30 Fitzpatrick, F.A., Gorman, R.R.: Regulatory role of cyclic 3',5'-monophosphate on the platelet cyclooxygenase and platelet function. *Biochem. Biophys. Act.* 582 (1979) 44
- 31 Flückiger, R., Winterhalter, K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1C} . *FEBS Lett.* 72 (1976) 356
- 32 Fuller, J.H., Keen, H., Jarret, R.J., Omer, T., Meade, T.W., Chkrabarti, R., North, W.R.S., Stirling, Y.: Hemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Br. Med. J.* 2 (1979) 964
- 33 Fuller, J.H.: Hemostatic Function Tests Associated with Diabetic Microangiopathy. *Horm. Met. Res. (Suppl. 11)* (1981) 59

- 34 Gabbay, K.H., Sosenko, J.M., Banuchi, G.A., Flückiger, R. : Glycosylated hemoglobins : Increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients. Diabetes 28 (1979)
- 35 Ganda, O.M.: Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic. Diabetes 29 (1980) 931
- 36 Garg, S.K., Lackner, H., Karpatkin, S. : The increased percentage of megathrombocytes in various clinical disorders. Ann.Intern.Med. 77 (1972) 361
- 37 Gilman, A.G. : A protein binding assay for $3',5'$ -cyclicmonophosphate. Proc.nat.Acad.Sci USA 67
- 38 Gorman, R.R., Bunting, S., Miller, O.V.: Modulation of human platelet adenylate cyclase by Prostacyclin (PGX) . Prostaglandins 13 (1977) 377
- 39 Gormsen, J., Nielsen, J.D., Andersen, L.A.: ADP-induced platelet aggregation in vitro in patients with ischemic heart disease and peripheral thromboatherosclerosis. Acta Med.Scand. 201 (1977) 509
- 40 Gross, R., Schneider, W.: Energy metabolism. In: S.A. Johnson, Hrsg.: The circulating platelet. - Academic Press, New York 1971
- 41 Haanen, C., Holdriut, A.: Blood platelet aggregation under various conditions and in some disease. Exp.Biol.Med. 3 (1968) 164
- 42 Harvey, J., Weiss, M.D.: Platelet physiology and abnormalities of platelet function. N. Engl. J.Med. 11 (1975) 531

- 43 Harlan, J.M., Harker, L.A.: Hemostatis, thrombosis, and thromboembolic disorders. The role of arachidonic acid metabolites in platelet-vessel wall interactions. *Med. Clin. N. Amer.* 65 (1981) 833
- 44 Heath, H., Bridgen, W.D., Canevar, J.V., Pollock, J., Hunter, P.R., Kelsey, J., Bloom, A.: Platelet adhesiveness and aggregation in relation to diabetic retinopathy. *Diabetologia* 7 (1971) 308
- 45 Hellem, A.J.: Adenosine diphosphate induced platelet adhesiveness in diabetes mellitus with complications. *Acta Med. Scand.* 190 (1971) 291
- 46 Hilsted, J., Madstad, S., Nielsen, J.D., Krarup, T., Sestoft, L., Gormsen, J.: Hypoglycemia and hemostatic parameters in juvenileonset diabetes. *Diab. Care* 3 (1980) 675
- 47 Ishisbashi, T., Tanaka, K., Taniguchi, Y.: Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. *Diabetes* 30 (1981) 601
- 48 Janka, H.U.: Spätfolgen des Diabetes mellitus. *Der inform. Arzt* 15 (1981) 26
- 49 Janka, H.U., Grünwald, P., Waldmann, G., Standl, E., Mehnert, H.: Carotisstenosen, kardiovaskuläres Risikoprofil und assoziierte Makroangiopathie bei Diabetikern. *Vasa* 11 (1982) 111
- 50 Janka, H.U., Standl, E.: Thrombozyten-Aggregation und -Adenylatzyklase-Aktivität bei Diabetikern. In: *Hämostase bei Herzfehlern und Angiopathien.* (Hrsg.: Schreiber, R., K. Bühlmeyer) Müller und Steinicke München (1981) 76

- 51 Janka, H.U., Standl, E., Mehnert, H.: Peripheral vascular disease in diabetes mellitus and its relation to cardiovascular risk factors: screening with the Doppler ultrasonic technique. *Diabetes Care* 3 (1980) 207
- 52 Janka, H.U., Standl, E., Mehnert, H.: Increased platelet adenylate cyclase activity in diabetic patients with microangiopathy. *Horm.Metabol.Res.* 26 (Suppl. 11) (1981)
- 53 Johnson, M., Harrison, H.E., Raftery, A.T., Elder, J.B.: Vascular prostacyclin may be reduced in diabetes in man. *Lancet* 1 (1979) 325
- 54 Joist, J.H., Balser, K., Schoenfeld, G.: Increased in-vitro platelet function in type II und type IV hyperbetalipoproteinemia. *Thrombos Res.* 15 (1979) 95
- 55 Jones, R.L., Paradise, C., Peterson, C.M.: Platelet survival in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 30 (1982) 486
- 56 Jones, R.L., Peterson, C.M.: Hematologic alterations in diabetes mellitus. *Am.J.Med.* 70 (1981) 339
- 57 Karpatkin, S.: Biochemical and clinical aspects of megathrombocytes. *Ann. NY Acad.Sci.* 201 (1972) 262
- 58 Karpatkin, S.: Heterogeneity of human platelets. II. Funktional evidence suggestive of young and old platelets. *J.Clin.Invest.* 48 (1969) 1083

- 59 Karpatkin, S.: Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. J.Clin.Invest. 48 (1969) 1073
- 60 Karpatkin, S.: Studies on human platelets glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate and agglutination and contraction on platelet glycolysis. J.Clin.Invest. 46 (1967) 409
- 61 Keller, U., Berger, W., Ritz, R., Truog, P.: Course and prognosis of 86 episodes of diabetic coma. A five year experience with a uniform, schedule of treatment. Diabetologia 11 (1975) 93
- 62 Krzywanek, H., Breddin, K.: Platelet aggregation as a risk factor in diabetic subjects. Horm.Meta-bol.Res. (Suppl. 11) (1981) 11
- 63 Kwaan, H.C., Colwell, J.A., Cruz, S., Suwanwela, N., Dobbie, J.G.: Increased platelet aggregation in diabetes mellitus. J.Lab.Clin.Med. 80 (1972) 236
- 64 Ludlam, C.A., Cash, J.D.: Studies on the liberation of β -thromboglobulin from human platelets in vitro. British J. of Hematol. 33 (1976) 239
- 65 Ludlam, C.A., Moore, S., Bolton, A.E., Pepper, D.S., Cash, J.D.: The release of a human platelet-specific protein measure by radioimmuno assay. Thromb.Res.hat (1975) 453

- 66 Marble, A., White, J.H., Fenald, A.T.: The nature of the lowered resistance to infection in diabetes mellitus. *J.Clin. Invest.* 17 (1938) 423
- 67 McLaren, E.H., Cullen, D.R., Brown, M.E.: Coagulation abnormalities in diabetic coma before and 24 hours after treatment. *Diabetologia* 15 (1979) 345
- 68 Moncada, S., Vane, J.R.: In biochemical aspects of prostagladins and thromboxanes (edited by N. Kharasch and J. Friend) New York (1977) p. 155
- 69 Moore, S., Pepper, D.S.: The Isolation and characterisation of a platelet-specific B-globulin (B-TG). *Biochim. et. Biophys. Acta* 379 (1975) 360
- 70 Newman, K.D., Williams, L.T., Bishopric, N.H., Lefkowitz, R.J.: Identification of α -adrenergic receptors on human platelets by (3 H)-dihydroergocryptine binding. *J.Clin.Invest* 61 (1978) 395
- 71 Nicolaou, K.C., Gasic, G.P., Barnette, W.E.: Synthesen und biologische Eigenschaften von Prostaglandinendoperoxiden, Thromboxanen und Prostacyclinen. *Angew. Chem.* 90 (1978) 360
- 72 Nobis, H., Bruneder, H., Falkensammer, Ch., Fischer M., Gauss, P., Korp, W., Ogris, E., Prachar, H., Weißmann, A., Wuketich, St.: Untersuchungen der Blutgerinnung im Coma diabeticum. *Intensivmed.* 12 (1974) 52
- 73 O'Brien, J.R.: The adhesiveness of native platelets and its prevention. *J. Clin. Path.* 14 (1961) 140

- 73 Odegard, A.E., Skalhegg, B.A., Hellem, A.J.: Increased activity of "anti-Willebrand factor" in diabetic plasma. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 11 (1964) 27
- 75 O'Malley, B.C., Ward, J.D., Timperley, W.R., Porter, N.R., Preston, F.R.: Platelet abnormalities in diabetic peripheral neuropathy. *Lancet* 2 (1975) 1274
- 76 Pecoraro, R.E., Graf, R.J., Halter, J.B., Beier, H., Porte, D.: Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes* 28 (1979)
- 77 Petersen, H.D., Gormsen, J.: Platelet aggregation in diabetes mellitus. *Acta Med. Scand.* 203 (1978) 125
- 78 Peterson, C.M., Jones, R.L., Koenig, R.J., Melvin, E.T., Lehrmann, M.L.: Reversible hematological sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 86 (1977) 425
- 79 Porta, M., Hildegard, P., Kohner, E.M.: Platelet shape change abnormalities in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 18 (1980) 217
- 80 Prachar, H., Korp, W., Machacek, I., Nobis, H., Wuketich, S.: Häufigkeit thromboembolischer Komplikationen beim Coma diabeticum. *Intensivmed.* 11 (1974) 366
- 81 Preston, F.E., Ward, J.D., Marcola, B.H., Porter, N.R., Timperley, W.R., O'Malley, B.C.: Elevated B-thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathy. *Lancet* 1 (1978) 238

- 82 Ptak, W., Hanczakowska, M., Zycka, R.: Impaired antibody responses in alloxan diabetic mice. *Clin. Exp. Immunol.* 29 (1977), 140
- 83 Renner, R., Hepp, K.D., Mehnert, H.: Behandlung der diabetischen Ketoazidose mit der angepaßten Insulininfusion. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 84 (1979)
- 84 Rosenblum, W.I., El-Sabban, F., Loria, R.M.: Platelet aggregation in the cerebral and mesenteric microcirculation of mice with genetically determined diabetes. *Diabetes* 30 (1981) 89
- 85 Ross, R., Glomset, J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis *New Engl. J. Med.* 295 (1976) 369
- 86 Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L.A.: A platelet-dependant serum factor that stimulates the proliferation of arterical smooth muscle cell in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1207
- 87 Sagel, J., Colwell, J.A., Crook, L., Laimins, M.: Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 82 (1972) 733
- 88 Salzman, E.W., Levine, L.: 3',5'-cyclic-AMP in human blood patelets. II. Effect of Dibutyryl-cyclic-3',5'-AMP on platelet function. *J. Clin. Invest.* 50 (1971) 131
- 89 Salzman, E.W., London, J.N., Rodiven, R.: Cyclic AMP in human blood patelets: relation to prostaglandin synthesis induced by centrifugation or surface contact. *J. Cyclic Nucl. Res.* 2 (1976) 25

- 90 Salzman, E.W., London, J.N., Rodvien, R.: Cyclic AMP in human blood platelets: relation to prostaglandin synthesis induced by centrifugation or surface contact. *J. Cyclic Nucl. Res.* 2 (1976) 25
- 91 Schernthaner, G., Silberbauer, K., Sinzinger, H., Müller, M.: Plasma β -thromboglobulins and glycosylated haemoglobin (HbA₁) in type I and II diabetes mellitus. *Thromb. Haemostas.* 42 (1979) 334
- 92 Schernthaner, G., Sinzinger, H., Silberbauer, K., Freyler, H., Mühlbauer, I., Kalim, J.: Vascular prostacyclin, platelet sensitivity to prostaglandins and platelet specific proteins in diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res. (Suppl. 11)* (1981)
- 93 Schneider, W., Morgenstern, E.: Zellbiologische Grundlagen der Plättchenfunktion. *Prakt. Anwendung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik.* (Hrsg. v. Voss, Göbel) Thieme (1980) 1
- 94 Shand, S.J., Bennet, J.S., Colman, R.W., Cooper, R.A.: Abnormalities of cholesterol phospholipid composition in platelets and low density lipoproteins of human hyperbetalipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.* 39 (1977) 341
- 95 Shattil, S.J., Bennet, J.S., Colman, R.W., et al: Abnormalities of cholesterol-phospholipid composition in platelets and low-density lipoproteins of human hyperlipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.* 89 (1977) 341
- 96 Shattil, S.J., Bennet, J.S.: Platelets and their membranes in hemostasis: Physiology and pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* 94 (1980) 168

- 97 Silberbauer, K., Schernthaner, G., Sinzinger, H., Piza-Katzer, H., Winter, M.: Decreased vascular prostacyclin in juvenileonset diabetes. *N. Engl. J. Med.* 300 (1979) 367
- 98 Silberbauer, K., Schernthaner, G., Sinzinger, H., Winter, M., Piza-Katzer, H.: Juveniler Diabetes mellitus: Verminderte Prostacyclin (PGI₂)-Synthese in der Gefäßwand. *VASA* 8 (1979) 213
- 99 Steet, M.L., MacIntyre, D.E., Levine, L.: Is prostacyclin a physiologically important circulating anti-platelet agent? *Nature* 283 (1980) 194
- 100 Stuart, M.J., Gerrard, J.M., White, J.G.: Effect of cholesterol on producing of thromboxane B₂ by platelets in vitro. *New Engl. J. Med.* 302 (1980) 6
- 101 Tan, J.S., Anderson, J.L., Watanakunakron, C., et al.: Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* 85 (1975) 26
- 102 Tateson, J.E., Moncada, S., Vane, J.R.: Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* 13 (1977) 389
- 103 Timperley, W.R., Preston, F.E., Ward, J.D.: Cerebral intravascular coagulation in diabetic ketoacidosis. *Lancet* I (1974) 952
- 104 Tindall, H.m Paton, R.C., Zuzel, M., McNicol, G.P.: Platelet life-span in diabetics with and without retinopathy. *Thromb. Res.* 21 (1981) 641
- 105 Tremoli, E., Folco, G., Agradi, E., Galli, C.: Platelet thromboxanes and serumcholesterol. *Lancet* I (1979) 107

- 106 Virchow, R.: Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. In: Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin. Meidinger, Frankfurt (Main) (1856) 458
- 107 Walter, H., Kemmler, W., Kronski, D., Franetzki, M., Prestele, K., Mehnert, H.: Therapie einer Typ-I-Diabetikerin mit Hilfe eines implantierten, programmierbaren Insulindosiergeräts. Akt. Endokrin. 3 (1982) 48
- 108 Walter, E., Deppermann, D., Badewin, I., Wahl, P., Weber, E.: Aggregation und Adhäsion sowie Glucosyltransferaseaktivität der Thrombozyten verschiedener Diabetiker-Gruppen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 83 (1977) 1169
- 109 Weksler, B.B., Nachmann, R.L.: Platelets and atherosclerosis. Amer. J. Med. 71 (1981) 331
- 110 Zahavi, J., Betteridge, D.J., Jones, N.A.G., Leyton, J., Galton, D.J., Kakkar, V.V.: Enhanced in-vivo platelets release reaction in diabetic patients with retinopathy. In: Angiology and Thrombosis, Serono Symposia, Academic Press, London 1981
- 111 Zahavi, J., Jones, N.A.G., Betteridge, D.J., Leyton, J., Galton, D.J., Clark, S.E., Kakkar, V.V.: Platelet factor 4, β -thromboglobulin, malondialdehyde formation and blood lipids in patients with diabetes mellitus. Thromb. Haemostas. 42 (1979) 334

- 112 Zahavi, J., Jones, N.A.G., Leyton, J., Dubiel, M., Kakkar, V.V.: Enhanced in-vivo platelet "release reaction" in old healthy individuals. Thromb. Res. 17 (1980) 329

- 113 Ziboh, V.A., Maruta, H., Lord, J., Cagle, W.D., Lucky, W.: Increased biosynthesis of thromboxane A₂ by diabetic platelets. Eur. J. Clin. Invest. 9 (1979) 223

- 114 Zieve, P.D., Greenough, W.B.: Adenyl cyclase in human platelets: activity and responsiveness. Biochem. and Biophys. Res. Communic. 35,4 (1969) 462

Lebenslauf

Peter Josef Helmut Demmel

07.06.1957 geboren in München

Eltern: Josef und Anneliese Demmel

1963-1967 Besuch der Grundschule in München

1967-1976 Besuch des Oskar-von-Miller-Gymnasiums, München

25.06.1976 Reifeprüfung

1976-1983 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

25.08.1978 Ärztliche Vorprüfung

30.08.1979 1. Teil der Ärztlichen Prüfung

19.03.1982 2. Teil der Ärztlichen Prüfung

03.05.1983 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

09.05.1983 Approbation als Arzt

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. H. Mehnert für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. H.-U. Janka für die freundliche und stets zuverlässige Betreuung.

Den medizinisch - technischen Assistentinnen Frau H. Stock und Frau S. Bünte danke ich für die Unterstützung bei den im Labor durchgeführten Messungen.

